



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Didymosphenia geminata (Lyngbye) M. Schmidt en el área andina de la provincia de Chubut: taxonomía, diversidad morfológica y genética y origen del alga invasora

Uyua, Noelia Mariel

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Sala, Silvia Estela

Co-dirección: Jones, Leandro Roberto

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2017

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20170804001546>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

***Didymosphenia geminata* (Lyngbye)
M. Schmidt en el área andina de la
provincia del Chubut: taxonomía,
diversidad morfológica y genética y
origen del alga invasora.**

***Didymosphenia geminata* (Lyngbye)
M. Schmidt en el área andina de la
provincia del Chubut: taxonomía,
diversidad morfológica y genética y
origen del alga invasora.**

por

Lic. NOELIA MARIEL UYUA
—

dirigida por

Dra. SILVIA ESTELA SALA y

Dr. LEANDRO ROBERTO JONES
—



Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Universidad Nacional de La Plata

2017

Dedicatoria

*Si estás conmigo no hay desafíos
que no pueda vencer...*

*A mi familia, quien me da la
inspiración y confianza día a día.*

Agradecimientos

Muchas personas han contribuido a este proyecto, por lo que quiero agradecer a todos.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis directores: a la Dra. Silvia Sala por su asesoramiento, apoyo y guía, no solo en lo profesional, sino también en lo personal y al Dr. Leandro Jones por asesorarme en este proyecto. A la Dra. Norma Santinelli quien fue mi asesora, consejera y apoyo en el transcurso de este trabajo. Un especial agradecimiento a Viviana Sastre, quien fue la persona que me introdujo en este mundo de la ficología.

Gracias también a la maravillosa gente del Instituto e Investigación en Hidrobiología y por su constante aliento y buena energía. Al personal del Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Sede Trelew, en particular al Lic. José García por ayudarme a solucionar siempre los problemas técnicos de último momento. Al grupo de la División Ficología de la Universidad de La Plata, en particular a la oficina 8, por haberme recibido siempre con los brazos abiertos y por haberme enseñado a trabajar en equipo. Al Laboratorio de Virología y Genética Molecular, particularmente a la Dra. Julieta Manrique por haberme brindado el espacio y asesoramiento en el campo de la genética. Al Lic. Gabriel Bauer, por permitirme acompañarlo en las campañas.

Un especial agradecimiento al Ministerio de Ambiente y Control del Desarrollo Sustentable y a la Secretaría de Pesca de la Provincia del Chubut por haberme facilitado las muestras del Plan de Monitoreo de *Didymosphenia geminata* y en especial a la Subsecretaría de Pesca Continental por haberme permitido participar de las campañas en el marco de ese Plan. A la Administración de Parque Nacionales, por haberme permitido acceder a tomar muestras dentro del Parque Nacional Los Alerces. A la Subsecretaría de Pesca de la Provincia de Santa Cruz y a la Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente de Tierra del Fuego por haberme facilitado muestras de cada una de las provincias.

Quiero agradecerle al Dr. Patrick Kocielek por su contribución y enseñanza en distintos aspectos del estudio de diatomeas y a la Dra Sarah Hamsher por su asistencia en informática y paciencia.

Por último, quisiera expresar mi sincero agradecimiento por todo el amor y apoyo de mi familia y amigos (gracias Mendo!), especialmente a mis padres por haberme acompañado y ayudado en muchos de los viajes necesarios para poder realizar esta tesis, mis suegros y, mi marido Francisco, quien durante el transcurso de este proyecto de investigación me dio la inspiración y estímulo que necesitaba durante los inevitables badenes del trabajo, compartiendo alegrías de éxitos y nuevos descubrimientos.

/Índice

<hr/>		<hr/>	
RESUMEN	17	CAPÍTULO II	
<hr/>		<hr/>	
ABSTRACT	21	MORFOLOGÍA VALVAR DEL GÉNERO	
<hr/>		<i>DIDYMOSPHENIA</i> EN LA PATAGONIA SUR	
<hr/>		<hr/>	
CAPÍTULO I		2.1 Introducción	53
INTRODUCCIÓN		2.2 Materiales y Métodos	54
<hr/>		2.2.1 Área de estudio	54
1.1 Invasiones Biológicas	27	2.2.2 Análisis morfológico mediante	
1.2 <i>Didymosphenia geminata</i>	29	microscopía óptica (MO) y	
1.2.1 Biología	29	electrónica de barrido (MEB)	60
1.2.2 Reproducción	31	2.3 Resultados	61
1.2.3 Ecología	32	2.3.1 <i>Didymosphenia geminata</i> en la	
1.2.4 Distribución	34	Provincia del Chubut	61
1.2.5 Invasión, Colonización	38	2.3.2 <i>Didymosphenia geminata</i> en la	
1.2.6 Impacto	40	Provincia de Tierra del Fuego	70
1.3 Taxonomía y Clasificación de		2.3.3 <i>Didymosphenia geminata</i> en la	
diatomeas (Bacillariophyceae)	41	Provincia de Santa Cruz	73
1.3.1 Taxonomía y Clasificación		2.4 Discusión	76
de <i>Didymosphenia</i>	44	2.5 Conclusión	82
1.4 Objetivo	47	<hr/>	
1.4.1 Objetivos particulares	47	CAPÍTULO III	
1.5 Hipótesis	48	UN PROTOCOLO OPTIMIZADO PARA LA	
<hr/>		EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS	
		BÉNTICAS DE <i>DIDYMOPHENIA GEMINATA</i>	
		<hr/>	
		3.1 Introducción	87
		3.2 Materiales y Métodos	88
		3.2.1 Diseño de muestreo	88
		3.2.2 Extracción y purificación de	
		ADN genómico total de	
		<i>Didymosphenia geminata</i>	89
		3.2.3 Diseño experimental y	
		análisis estadístico	92
		3.3 Resultados	93
		3.4 Discusión	98
		3.5 Conclusión	101
		<hr/>	

CAPÍTULO IV

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *DIDYMOSPHEIA GEMINATA* DE LA PATAGONIA SUR ARGENTINA

4.1	Introducción	105
4.2	Materiales y Métodos	107
4.2.1	Muestreo	107
4.2.2	Extracción de ADN genómico total a partir de células aisladas	108
4.2.3	Amplificación y secuenciación de marcadores moleculares	110
4.2.4	Análisis de secuencias	112
4.3	Resultados	112
4.4	Discusión	119
4.5	Conclusión	122

CAPÍTULO V

DISTRIBUCIÓN DE *DIDYMOSPHEIA* *GEMINATA* EN LA PROVINCIA DE CHUBUT

5.1	Introducción	127
5.2	Materiales y Métodos	130
5.3	Resultados	133
5.4	Discusión	137
5.5	Conclusiones	138

CAPÍTULO VI

CONSIDERACIONES FINALES

6.1	Conclusión	143
6.2	Recomendaciones	145

BIBLIOGRAFÍA	151
---------------------	------------

ABREVIATURAS	173
---------------------	------------

ANEXO I

SOLUCIONES

AI.1	Preparaciones de agentes orgánico	179
AI.2.	Soluciones stock de químicos	179
AI.3	Buffers	180
AI.4	Stock y buffers de enzimas	181
AI.5	Buffers de Electroforesis y Geles de siembra	181

ANEXO II

RESULTADOS ADICIONALES	183
-------------------------------	------------

ANEXO III

SITIOS DE MUESTREO	187
---------------------------	------------

/Índice de figuras

CAPÍTULO I

Fig. 01	Mapa de distribución mundial de <i>D. geminata</i>	36
Fig. 02	Reconstrucción filogenética de Heterokonta	43
Fig. 03	Reconstrucción filogenética de Bacillariophyceae	44
Fig. 04	Clasificación simplificada del grupo Bacillariophyceae	45

CAPÍTULO II

Fig. 05	Mapa del área de estudio en la provincia del Chubut	56
Fig. 06	Mapa del área de estudio en las provincias de Santa Cruz y Tierra del Fuego	58
Fig. 07	Colonia inicial de <i>D. geminata</i> en la provincia del Chubut	62
Fig. 08	Colonia de <i>D. geminata</i> .	63
Fig. 09	MO. Floración de <i>D. geminata</i>	64
Fig. 10	MO. <i>Didymosphenia</i> de la provincia del Chubut	66
Fig. 11	MEB. <i>Didymosphenia</i> de la provincia del Chubut	68
Fig. 12	MEB. Frústulo en vista externa de <i>Didymosphenia</i> de la provincia del Chubut	69
Fig. 13	MEB. Frústulo en vista interna de <i>Didymosphenia</i> de la provincia del Chubut	70
Fig. 14	MO. <i>Didymosphenia</i> de la provincia de Tierra del Fuego	71
Fig. 15	MEB. <i>Didymosphenia</i> de la provincia de Tierra del Fuego	72
Fig. 16	MEB. Frústulo en vista externa de <i>Didymosphenia</i> de la provincia de Tierra del Fuego	72
Fig. 17	MEB. Frústulo en vista interna de <i>Didymosphenia</i> de la provincia de Tierra del Fuego	73
Fig. 18	MO. <i>Didymosphenia</i> en la provincia de Santa Cruz	74
Fig. 19	MEB. <i>Didymosphenia</i> en la provincia de Santa Cruz	75
Fig. 20	MEB. Morfología valvar externa de los dos morfotipos de la provincia de Santa Cruz	75
Fig. 21	MEB. Frústulo en vista interna de <i>Didymosphenia</i> del Morfotipo 2 de la provincia de Santa Cruz	76

CAPÍTULO III

Fig. 22	MO. <i>D. geminata</i> antes y después del procedimiento de extracción de ADN	93
Fig. 23	Box plot de la razón A260/A280 observadas para las preparaciones de ADN obtenidos por los seis métodos estudiados.	95
Fig. 24	Box plot de concentraciones de ADN obtenidas por las distintas técnicas de purificación	95
Fig. 25	Diagrama de dispersión de la cantidad de ADN frente a A260	97
Fig. 26	Rendimiento de la amplificación de ADN obtenida por los métodos estudiados	97
Fig. 27	Rendimiento de la PCR para los distintos métodos estudiados	98

CAPÍTULO IV

Fig. 28	Dispositivos para llevar a cabo el aislamiento de las células de <i>D. geminata</i> .	108
Fig. 29	Células de <i>D. geminata</i> aisladas mediante el dispositivo utilizado en esta Tesis	109
Fig. 30	Amplificación del gen 18S utilizando primers específicos para <i>D. geminata</i>	110
Fig. 31	Desempeño de diferentes ensayos de amplificación mediante la primera ronda de PCR en gradiente.	113
Fig. 32	Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de las secuencias del gen COX-1	115
Fig. 33	Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de las secuencias del gen 18S	117
Fig. 34	Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de la secuencias del gen <i>rbcL</i>	119

CAPÍTULO V

Fig. 35	Mapa de la distribución actual de <i>D. geminata</i> en la Patagonia argentina	129
Fig. 36	Dispersión de <i>D. geminata</i> en la provincia del Chubut 2010-2015	134
Fig. 37	Dinámica de las floraciones de <i>D. geminata</i> en relación a los caudales del Río Futaleufú	136
Fig. 38	Evolución de la floración de <i>D. geminata</i> en el Río Futaleufú	136

ANEXOS

Fig. AII.1	PCR en gradiente de temperaturas	183
Fig. AII.2	Electroforesis en gel de las extracciones de ADN llevados a cabo con los distintos métodos testeados en este estudio	184

/Índice de tablas

CAPÍTULO II

Tabla 1	Datos morfométricos de <i>Didymosphenia</i> en el Río Futaleufú	67
Tabla 2	Datos morfométricos de <i>Didymosphenia</i> en tres ríos de la provincia del Chubut	67
Tabla 3	Comparación de datos morfométricos de materiales estudiados y taxas cercanas del género	77

CAPÍTULO III

Tabla 4	Comparación de los cinco métodos de extracción de ADN estudiados	91
Tabla 5	Absorbancias de los extractos de ADN obtenidos por los seis métodos de extracción estudiados	94
Tabla 6	Relación entre la cantidad de ADN y la absorbancia a 260 nm	96

CAPÍTULO IV

Tabla 7	Resusltados de la primera ronda de PCR	107
Tabla 8	Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo los estudios moleculares	111
Tabla 9	Variabilidad de las secuencias del gen 18S	116
Tabla 10	Distancias genéticas entre las secuencias del gen <i>rbcL</i>	118

CAPÍTULO V

Tabla 11	Sitios analizados	131
-----------------	-------------------	-----

CAPÍTULO V

Tabla AIII.1	Sitios de muestreo del plan de monitoreo de la provincia del Chubut	187
---------------------	---	-----

RESUMEN

La temática abordada en el presente trabajo está vinculada a los problemas que, a nivel mundial, causa *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt. Esta es una especie de diatomea de agua dulce que forma grandes floraciones de matas mucilaginosas (Gretz, 2008; Blanco & Ector, 2009; Whitton *et al.*, 2009). A diferencia de las floraciones algales planctónicas que están relacionadas con el aumento de las concentraciones de nitrógeno y fósforo, los crecimientos masivos de *D. geminata*, en general están asociados a ambientes pobres en nutrientes y en muchos casos prístinos o con disturbios ecológicos limitados (Jónsson *et al.*, 2000 en Spaulding & Elwell, 2007; Larson & Taylor, 2011). Cuando esta especie, conocida vulgarmente como “moco de roca” o “didymo”, produce floraciones, forma matas que presentan aspecto de algodón mojado de color amarillo amarronado (Segura, 2011). Se ha propuesto que *D. geminata* tendría originalmente una distribución Holártica, restringida a aguas frías, templadas y prístinas (Spaulding & Elwell, 2007; Blanco & Ector, 2009; Whitton *et al.*, 2009). En los últimos 15 años, hubo un notorio incremento en la frecuencia de reportes de floraciones, lo cual ha llamado la atención no solo de científicos, sino también de autoridades gubernamentales en todo el mundo ya que han provocado grandes daños ecológicos (como por ejemplo alteración de la estructura de las cadenas alimentarias y las características hidráulicas de ríos y arroyos) y producido efectos económicos negativos (afectando el turismo, las pesquerías y la industria hidroeléctrica) (Kawecka & Sanecki, 2003; Kilroy, 2004; Kirkwood *et al.*, 2007; Beltrami *et al.*, 2008; Bhatt *et al.*, 2008; Blanco & Ector, 2008; Bergey *et al.*, 2009; Kilroy *et al.*, 2009; Kirkwood *et al.*, 2009; Pite *et al.*, 2009; Whitton *et al.*, 2009).

La idea preponderante respecto a la especie es que *D. geminata* ha “invadido” el Hemisferio Sur vehiculizada por el hombre. Sin embargo, hay registros puntuales de *D. geminata* en el Hemisferio Sur desde hace 50 años. Si bien en Argentina no existen registros anteriores al año 2010 (Sastre *et al.*, 2013), lo que sugiere que el alga podría haber sido introducida en tiempos recientes, existen registros del alga desde la década del sesenta en Chile (Asprey *et al.*, 1964; Rivera, 1983; Rivera & Gebauer, 1989) y en Nueva Zelanda (Chapman, 1957).

El principal objetivo de esta investigación fue identificar y analizar, a través de los análisis morfológicos y moleculares, las poblaciones de *Didymosphenia* de la provincia del Chubut

para comprender el origen y la dinámica de la invasión. Si bien siempre se consideró que las floraciones de *Didymosphenia* en Argentina son producto de una o más introducciones favorecidas por la capacidad de la especie de permanecer viable fuera del agua por largos periodos de tiempo, siendo el hombre el principal vector de dispersión, esta hipótesis nunca ha sido evaluada científicamente. En este trabajo se analiza dicha posibilidad así como la hipótesis alternativa: las floraciones de *Didymosphenia geminata* responden a cambios ambientales globales que han favorecido la expansión de cepas locales de la especie.

Para llevar a cabo los objetivos de este trabajo, se analizaron 300 muestras de 61 sitios, de los cuales cinco fueron seleccionados para describir la morfología, morfometría y analizar 3 marcadores genéticos de las poblaciones de la especie. Los análisis morfológicos y genéticos llevados a cabo indican que la especie presente en la Patagonia argentina es *Didymosphenia geminata*, aunque existe mucha variabilidad morfológica dentro y entre las poblaciones de la especie. La existencia de una variación morfológica asociada a la distribución geográfica podría explicar estas observaciones, lo cual sugiere la posibilidad de que las grandes floraciones reportadas recientemente puedan corresponder al desarrollo de poblaciones nativas en respuesta a algún tipo de cambio en las condiciones ambientales, en contraposición a la idea de colonización por cepas introducidas por la acción del hombre.

El estudio genético de *D. geminata* se encuentra en una etapa inicial, existiendo muy pocas secuencias moleculares en todo el mundo (Cary *et al.*, 2014; Jaramillo *et al.*, 2015; Kernmarrec *et al.*, 2011; Khan-Bureau *et al.*, 2016). Análisis detallados realizados en esta Tesis demostraron que *D. geminata* es una fuente recalcitrante de ácidos nucleicos y que el alga presenta inhibidores enzimáticos, posiblemente metales pesados. Dicho descubrimiento explica la escasa cantidad de datos disponibles y las dificultades observadas por otros investigadores en la generación de datos moleculares para esta especie y posiblemente otras especies relacionadas (Jaramillo *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2017). Asimismo, dichos resultados pone una alarma para el desarrollo de métodos moleculares cuantitativos para la detección del alga, ya que la persistencia de inhibidores puede resultar en importantes errores si no se toman los recaudos necesarios. Tal como se observó en trabajos recientes de otros grupos de investigación, los 3 marcadores genéticos comunmente utilizados en otros grupos biológicos (genes 18S, *rbcL* y COX-1) presentaron una diversidad molecular relativamente baja entre los sitios estudiados, aunque la variabilidad observada para nuestra región fue similar a la observada globalmente. Esto indica que si las floraciones recientes se deben a una invasión, existe un mecanismo dispersivo que genera una gran presión de propágulos, de forma tal que en muy poco tiempo (~10-15 años) se ha podido establecer una diversidad similar a la observada en todo el planeta. Otra posibilidad es que la microalga haya estado circulando durante mucho tiempo en la región, pudiendo alcanzar a lo largo de dicho lapso niveles de diversidad equiva-

lentes a la diversidad global del alga, mediante diversificación local o dispersión natural a largo plazo. Independientemente de si la especie es invasora o no en Argentina, el hombre es considerado un agente de dispersión de *D. geminata* a nuevas cuencas a nivel mundial (Spaulding & Elwell, 2007; Bothwell *et al.*, 2009; Segura, 2011). La observación microscópica del agua salina utilizada para el lavado y desinfección de los equipos de pesca en el puesto de control ubicado en el Río Futaleufú en la Provincia del Chubut, ha permitido verificar la presencia de frústulos de *D. geminata* y, en consecuencia, sugiere que la actividad de la pesca deportiva actúa como un vector de dispersión al menos a nivel local (Sastre com. pers.).

Esta Tesis presenta las primeras secuencias del gen COX-1 de *D. geminata*, un marcador que es de uso muy extendido en estudios de códigos de barra de ADN. La ausencia de secuencias de dicho gen de especies cercanas a *D. geminata* impide arribar a conclusiones definitivas. No obstante comparaciones realizadas con una gran cantidad de secuencias de diatomeas disponibles en GenBank demostró que este marcador tiene un potencial significativo para el desarrollo de códigos de barra genéticos en *D. geminata*.

Hasta el momento, desde la primera detección de las floraciones en Argentina en el Río Futaleufú, *Didymosphenia geminata* ocupa las cuencas de los ríos Futaleufú, Manso y Puelo, Corcovado y Pico, Chubut y Senguer, es decir, en las ecoregiones Bosque Andino y Estepa Patagónica de la Provincia del Chubut. Además, se encuentra presente en las provincias de Neuquén, Río Negro, Santa Cruz y Tierra del Fuego.

Si bien no fue posible determinar el origen de la diatomea *D. geminata* presente en nuestro país, a partir de los estudios realizados, y la consideración de trabajos anteriores sobre el potencial rol del fósforo en las floraciones (Ellwood & Whitton, 2007; Taylor & Bothwell, 2014), surge una nueva hipótesis que integra a las planteadas en esta tesis: las floraciones de *Didymosphenia* en Argentina son producto de una o más introducciones ocurridas varias décadas atrás, siendo favorecidas las recientes floraciones, por cambios ambientales globales y/o deriva génica que han favorecido la expansión de las cepas de la especie.

ABSTRACT

This investigation is focused in the diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt, who causes ecologic impacts worldwide. *D. geminata* is a freshwater diatom that forms dense soggy carpet-like layers, several inches thick, lining the bottom of the aquatic environments where it lives (Gretz, 2008; Blanco & Ector, 2009; Whitton *et al.*, 2009). Massive growth of *D. geminata* is generally associated with nutrient-poor environments and, in many cases, pristine or with limited ecological disturbances waters, unlike planktonic algal blooms that are related to high concentrations of nitrogen and phosphorus (Jónsson *et al.*, 2000 in Spaulding & Elwell, 2007; Larson & Taylor, 2011). This species, known as “rock snot” or “didymo”, produces blooms that look like brownish-yellow wet cotton. It has been proposed that *D. geminata* had a Northern Hemisphere origin, circumscribed to cold and clear waters. During the last fifteen years, there was an increment in the blooming reports frequency, which has called the attention not only of scientists but also of government authorities all around the world, due to the serious ecologic damage (for example changes in food chain structure and rivers and streams hydraulic characteristics) and economic lost that has affected tourism, fisheries and hydroelectric industries (Kawecka & Sanecki, 2003; Kilroy, 2004; Kirkwood *et al.*, 2007; Beltrami *et al.*, 2008; Bhatt *et al.*, 2008; Blanco & Ector, 2008; Bergey *et al.*, 2009; Kilroy *et al.*, 2009; Kirkwood *et al.*, 2009; Pite *et al.*, 2009; Whitton *et al.*, 2009).

The main idea is that *D. geminata* has invaded the Southern Hemisphere spread by men, notwithstanding the fact that there are specific records dating from 50 years ago. Despite in Argentina there are not previous records before the year 2010 (Sastre *et al.*, 2013) - that suggests that the species could have been introduced very recently - there have been records in Chile and New Zeland since the sixties (Asprey *et al.*, 1964; Rivera, 1983; Rivera & Gebauer, 1989; Chapman, 1957).

The main goal of this investigation has been to identify and analise different populations of *Didymosphenia* from the Chubut Province -through morphologic and molecular analysis- to find the origin and dynamic of the invasion. It is considered that blooms of *D. geminata* in Argentina are the result of one or more introductions, favored by the capacity of the species to survive out of the water for long periods, and that man is the vector that spreads it. However,

this hypothesis has never been scientifically evaluated. In this work we tested this possibility and we present an alternative hypothesis: blooms of *D. geminata* are favored by global environmental changes, which favor the local lineage spread.

To achieve the objectives of this work, 300 samples from 61 places were analyzed. Populations from 5 sites were selected to describe the morphologic, morphometric and 3 genetic markers of the species. The morphologic and genetics analysis showed that *Didymosphenia geminata* is the species present in Argentina, although there is high morphologic variability in and among the population of the species. These observations could be explained by the existence of a morphological variation associated to geographic distribution. This suggests the possibility that the recent reported blooms could be the result of the development of native populations in response to certain changes in environmental conditions; opposed to the idea of colonization by one lineage introduced by man.

Genetic analyses of *D. geminata* are at an early stage, with very few molecular sequences worldwide (Cary *et al.*, 2014; Jaramillo *et al.*, 2015; Kermarrec *et al.*, 2011; Khan-Bureau *et al.*, 2016). The analysis made in this thesis show that *D. geminata* benthic samples are recalcitrant DNA sources in terms of both DNA yield and the potential persistence of enzymatic inhibitors, possibly heavy metals. This finding explains the scarce amount of available data and the difficulties observed by other researchers in generating molecular data for this and other related species (Jaramillo *et al.*, 2015, Keller *et al.*, 2017). Also, these results set an alarm for the development of quantitative molecular methods for the detection of this alga, since, if the necessary precautions are not taken, the persistence of inhibitors can result in important errors. As observed in recent investigation from other research groups, the 3 genetic markers commonly used in other biological groups -genes 18S, *rbcL* and COX-1- had relatively low molecular diversity among the sites studied, although the variability detected in our region was similar to that observed globally. This indicates that if the recent blooms are due to an invasion, there is a dispersive mechanism that generates a great pressure of propagules, so, in a very short time (~ 10-15 years), it has been possible to establish a diversity similar to the observed worldwide. Another possibility is that the algae has been circulating for a long time in our region, being able to reach similar levels of diversity to the global one, through local diversification or natural dispersion in the long term. Whether the species is invader or not in Argentina, man is considered to be the dispersing agent of it (Spaulding & Elwell, 2007; Bothwell *et al.*, 2009; Segura, 2011). The microscopic observation of the salty water used to wash and disinfect the fishery equipment controlled in the Futaleufú river watch point, has proved the presence of *D. geminata* frustules. Thus confirming that sport fishery is a vector of spread, at least to a local level (Sastre com. pers.).

This thesis presents the first sequences of the COX-1 gene of *D. geminata*, a widely

used marker in studies of DNA barcoding. The lack of sequences of this gene of related species to *D. geminata*, impedes to reach definitive conclusions. However comparisons made with a large number of diatom sequences available from GenBank, showed that this marker has a significant potential for the development of genetic barcoding in *D. geminata*.

Up to now, since the first bloom detection in Argentina in Futaleufú River, *D. geminata* is present at Futaleufú, Manso y Puelo, Corcovado y Pico, Chubut and Senguer basins, comprising both eco-regions, the Andean Forest and Patagonic steppe. Besides, it is also present in the provinces of Neuquén, Río Negro, Santa Cruz y Tierra del Fuego.

It was not possible to determine the origin of the Argentinian *D. geminata* populations, based on the studies carried out in this thesis and the considerations of previous work on different topics (Asprey et al. 1964; Rivera & Gebauer, 1989; Ellwood & Whitton, 2007; Taylor & Bothwell, 2014) However, a new hypothesis rise up joined to the both sustained in this thesis: *D. geminata* blooms in Argentina are the result of one or more introductions occurred several decades ago, and the recent blooms have been favored by recently global environmental changes and genetic drift, which have favored the spread of *D. geminata* lineage.

CAPÍTULO I

Introducción

INTRODUCCIÓN

1.1 Invasiones biológicas

Algunos autores consideran que la biodiversidad está experimentando una transformación extraordinaria como consecuencia de los efectos de las actividades humanas en todos los ecosistemas (Sala *et al.*, 2000). Entre los muchos componentes del cambio global de los últimos años, las invasiones biológicas representan uno de los fenómenos con consecuencias de mayor alcance, encontrándose entre las cinco causas principales de la disminución de la biodiversidad (Richardson & Pásek, 2006; Pásek *et al.*, 2008; Seastedt *et al.*, 2015).

El éxito de las invasiones ha sido estudiado por más de 50 años (Pyšek & Richardson, 2006). Entre otros factores, este éxito se debería a la interacción entre la invasividad de las especies y invasibilidad de las comunidades (Richardson & Pyšek, 2006). El concepto de “Invasividad de especies” se refiere a un rasgo que posee una especie que aumenta la probabilidad de que ésta se establezca, se extienda en una nueva zona y tenga un impacto. El concepto de “Invasibilidad de la comunidad”, se relaciona con la vulnerabilidad de una comunidad para ser invadida por ciertos atributos que posee tales como la diversidad de especies nativas o diversidad funcional. Elton (1959) propuso una hipótesis basada en la noción teórica de que, en comunidades menos diversas las interacciones intraespecíficas son más débiles debido a que están disponibles más nichos vacíos. Además, la captación de recursos reducida en las comunidades pobres en especies, lleva a que haya recursos libres, haciendo que estas comunidades sean más propensas a ser invadidas que las comunidades ricas en especies. Por otro lado, factores físicos ambientales tales como perturbaciones, disponibilidad de nutrientes y el clima, así como la eficiencia del transporte del vector de la invasión que pueden fortalecer la presión de propágulos, son también factores importantes que explican las invasiones exitosas (Leishman & Thomson, 2005).

Por otro lado, la interacción entre los vectores de propagación y las múltiples introducciones revelan patrones importantes asociados con el éxito de invasión (Roman & Darling, 2007): poblaciones pequeñas y un fuerte efecto fundador caracterizan a las primeras etapas del establecimiento y colonización de las invasiones biológicas, como consecuencia de que, por lo general, sólo unos pocos propágulos llegan a la nueva área (Allendorf & Lundquist, 2003). Este cuello de botella genético está sujeto a una fuerte deriva génica, lo que resulta

en una reducción de la diversidad genética en comparación con las poblaciones nativas. Sin embargo, autores como Roman & Darling (2007) proponen una hipótesis alternativa donde los cuellos de botella demográficos podrían tener un impacto positivo en las poblaciones introducidas purgando alelos deletéreos, preservando linajes clonales altamente adaptados de la recombinación sexual, o a través de otros mecanismos genéticos. Además, luego de la invasión, un aumento rápido de la población inicial podría producir muchas oportunidades para generar nuevas variantes genéticas a través de mutaciones o recombinación siendo beneficioso para el establecimiento en la nueva área (Otto & Whitlock, 1997). En algunos casos, las poblaciones pueden invadir un nuevo ambiente con éxito sin variación genética, siendo en este caso, importante la plasticidad fenotípica (Roman & Darling, 2007). Experimentos realizados en plantas vasculares sugieren que la plasticidad fenotípica (no adaptación) ha permitido a la especie colonizar diversos hábitats (Roman & Darling, 2007).

La Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO, define el término floraciones algales nocivas (FAN) como un término genérico utilizado por la comunidad científica para referirse a las floraciones de fitoplancton, las floraciones de microalgas, floraciones de algas tóxicas, las mareas rojas o a las algas dañinas, todos fenómenos naturales. Alrededor de 300 especies de microalgas pueden proliferar formando las denominadas: floraciones, y casi un cuarto de estas especies son conocidas por producir toxinas. Las floraciones algales nocivas han sido reconocidas por los especialistas a nivel mundial como un tema prioritario. Estos organismos poseen características como combinación de la reproducción sexual y asexual, alta tolerancia a los factores físicos, altas tasas de crecimiento demográfico, tamaños pequeños, entre otras, que además favorecen su transporte y establecimiento exitoso en un hábitat por lo que en algunos casos pueden comportarse también como especies invasoras no nativas (Litchman, 2010; Amalfitano *et al.*, 2015). En las últimas décadas, las floraciones producidas por microalgas, han cobrado una connotación alarmante debido al aparente incremento en el número de especies que los producen, la frecuencia, la duración e intensidad, así como su extensión geográfica (Hallegraef, 1993; Dale *et al.*, 2003) afectando la biodiversidad y los distintos componentes de los ecosistemas (Sala *et al.*, 2000). Ante la problemática, distintas organizaciones internacionales y regionales han creado programas para coordinar investigaciones tendientes a comprender las causas que las producen, y promover una eficiente gestión que mitigue sus efectos perjudiciales (Enevoldsen & Aguilera, 2002).

En ambientes dulceacuícolas, las proliferaciones algales nocivas son producidas principalmente por cianobacterias y dinoflagelados planctónicos, siendo poco frecuentes las ocasionadas por algas bentónicas. Esta es una de las razones por las que el caso de la diatomea invasora *Didymosphenia geminata* es un fenómeno particular. La invasión y las floraciones producidas por parte de esta diatomea en el Hemisferio Sur se ha caracterizado como uno de

los más agresivos de las últimas décadas con importantes impactos ecológicos y económicos resultantes de la tasa de expansión y el número de ríos afectados (Blanco & Ector, 2009; Kilroy & Unwin, 2011; Bus Leone *et al.*, 2014; Montecino *et al.*, 2014). Si bien, hasta el momento, no se contaba con investigaciones que establecieran de manera fehaciente la identidad de la especie presente en la Patagonia argentina ni si se trataba de una especie exótica, dada la presencia sostenida de la especie en diferentes sitios del territorio Nacional, en el año 2012, la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación elaboró la Resolución SAyDS N° 991/12, mediante la cual establece en su Artículo 1°: “Declarar a la especie *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt como Especie Exótica Invasora en el ámbito territorial de la República Argentina.”

Desde 2010, en la provincia del Chubut, se lleva a cabo el Plan de Prevención y Control de la especie en cuencas cordilleranas (aprobado por resolución conjunta del Ministerio de Ambiente y Control del Desarrollo Sustentable y la Secretaría de Pesca). En este marco se realiza el monitoreo de esta especie en las cuencas andinas de la provincia, lo que permitió detectar su presencia en Argentina (Sastre *et al.*, 2010). Si bien hasta el presente se han tomado medidas de prevención y difusión de esta problemática para alertar y establecer algunas pautas de manejo, es necesario realizar estudios de base sobre la especie para contar con más herramientas para la toma de decisiones.

1.2 *Didymosphenia geminata*

1.2.1 Biología

Didymosphenia geminata (comúnmente llamada “didymo” o “moco de roca”) es una diatomea unicelular de agua dulce. Las diatomeas (Bacillariophyceae) son un diverso grupo de algas unicelulares o coloniales que poseen la característica de presentar una cubierta celular de dióxido de silicio (SiO₂) denominada frústulo. Viven en una gran variedad de hábitats, tanto marinos como de agua dulce y terrestre (Kociolek *et al.*, 2015). Se las puede encontrar en ambientes muy variados, con un amplio rango de valores de pH, de concentraciones de solutos, nutrientes y temperaturas, aunque las especies generalmente están delimitadas a condiciones ecológicas más o menos restringidas (Kociolek *et al.*, 2015). Cumplen un papel fundamental en los ciclos del silicio y carbono, y son utilizadas en el monitoreo ecológico, la reconstrucción paleoecológica, y la correlación estratigráfica (Graham & Wilcox, 2000). Las diatomeas, junto a las algas verdes, son los organismos eucariotas acuáticos más diversos (Graham & Wilcox, 2000).

Didymosphenia geminata es considerada dentro del linaje de las diatomeas cymbeloides (Kociolek & Stoermer, 1993). Las células poseen rafe y un campo apical de poros a través

del cual secretan un pedúnculo que les permite sujetarse al sustrato (rocas o macrofitas), además de cumplir funciones metabólicas aparentemente relacionadas con la disponibilidad de nutrientes. Cuando la diatomea se divide (reproducción vegetativa), el pedúnculo también se divide (Spaulding & Elwell, 2007). Como resultado de la reproducción vegetativa, se forman matas algales que pueden alcanzar varios centímetros de espesor y cubrir varios cientos de metros cuadrados del lecho de un río. La célula de la diatomea no es en sí misma la responsable de los impactos si no la producción del pedúnculo extracelular (Spaulding & Elwell, 2007). Una de las funciones de esta estructura es elevar la célula del sustrato para así quedar expuesta a la luz, a las corrientes que permiten el intercambio gaseoso, a la fuente de nutrientes y evitar la competencia (Aboal *et al.*, 2012). Este pedúnculo está compuesto de nanoestructuras granulares y tubulares (Kociolek & Stoermer, 1993; Aboal *et al.*, 2012), pero recientemente se halló que también son secretadas nanofibras de calcita conteniendo sílice amorfo y calcita cristalina (Ehrlich *et al.*, 2016). Los autores sugieren que la calcita le brinda soporte mecánico al pedúnculo, mayor diámetro, y que funcionaría como reservorio de pequeños iones y moléculas. Además sugieren que la actividad de las enzimas anhidrasas carbónicas (AC), que en microalgas se encargan de la regulación de los mecanismos de concentración de carbono y funciones respiratorias en respuesta a cambios ambientales de CO², le darían la capacidad a *D. geminata* de bioerosionar el sustrato siendo capaz de disolver el carbonato de calcio y usarlo como fuente de iones de Calcio. La actividad de la enzima en la parte externa (periplasmática) fue más del 50% del total de la actividad registrada y como la elongación del pedúnculo de *D. geminata* está inversamente relacionada a la disponibilidad de fósforo, los ambientes ricos en CO² estimularían la actividad de las AC que producen la bioerosión, adhesión y elongación del mismo. La producción del material también estimularía la deposición de calcita biogénica (producida por la actividad de AC). Los autores sugieren que estos dos procesos en conjunto contribuyen al éxito de *D. geminata* en una amplia variedad de ambientes. Además Ehrlich *et al.* (2016) plantean la hipótesis de que el CO² atmosférico contribuye a la formación de las recientes floraciones de ésta diatomea invasora.

A diferencia de las floraciones algales planctónicas relacionadas con el aumento de las concentraciones de nutrientes, los crecimientos masivos de *D. geminata*, en general están asociados a ambientes oligotróficos, en muchos casos prístinos o con disturbios ecológicos limitados (Jónsson *et al.*, 2000; Larson & Taylor, 2011). Sundareshwar y colaboradores (2011) han sugerido que la capacidad de formar floraciones en condiciones de baja concentración de nutrientes estaría relacionada con el hierro, en particular, con los cambios redox férrico-ferroso que resultan en la acumulación y reciclaje de fósforo. Bothwell y colaboradores (2012) argumentan que la producción del pedúnculo impulsado fotosintéticamente ocurre cuando las tasas de división celular y la concentración de nutrientes son limitados y los niveles de luz

CAPÍTULO I

1.2 *D. geminata*

1.2.1 Biología

son elevados (Kilroy & Bothwell, 2011) refutando la hipótesis del hierro basado en una falta de asociación entre enriquecimiento de hierro con la absorción de fósforo, y la observación de que las floraciones se producen principalmente en los ríos pobres en hierro. Además, Kilroy & Bothwell (2011) demostraron que en condiciones de baja concentración de nutrientes, aumenta la longitud del pedúnculo (excepto en bajas intensidades de luz y temperatura) como parte de un mecanismo de transferencia de carbono fijado y, en cambio, en condiciones de nutrientes elevados, aumenta la tasa de división celular mientras que la longitud del pedúnculo disminuye. A su vez, Bothwell y colaboradores (2014) proponen que la baja concentración de fósforo reactivo soluble (SRP ~ 2 ppb) se debe a procesos de oligotrofización que están ocurriendo a nivel mundial por la deposición atmosférica de nitrógeno reactivo proveniente de distintas fuentes como la quema de combustibles fósiles y actividades como la agricultura. Por otro lado, otra hipótesis para explicar la capacidad de *D. geminata* de producir floraciones en condiciones oligotróficas, es la presencia de fosfomonoesterasa en los pedúnculos, que le daría la capacidad de utilizar fósforo orgánico cuando las concentraciones de fósforo son bajas (Ellwood & Whitton, 2007). Hammond (2013) plantea que las hipótesis de Kilroy & Bothwell (2011) y Ellwood & Whitton (2007) no son mutuamente excluyentes pudiendo ser que las floraciones sean provocadas por la sobrecarga fotosintética, según la hipótesis de Kilroy & Bothwell (2011), pero sostenidas por fósforo orgánico hidrolizado en pedúnculos, como plantea la hipótesis de Ellwood & Whitton (2007).

1.2.2 Reproducción

Las diatomeas poseen reproducción sexual y asexual en su ciclo de vida.

El frústulo está compuesto por dos valvas desiguales llamadas epiteca (la de mayor tamaño) e hipoteca (la de menor tamaño). En este grupo, la reproducción asexual se produce por fisión binaria donde las valvas del frústulo se separan y cada valva funciona como epiteca de la célula hija. Seguidamente, se forman las nuevas hipotecas dentro de los límites de la epitecas. Como resultado, las células hijas poseen diferente tamaño: una célula es del mismo tamaño que la célula parental y la otra es más pequeña. Los descendientes de un clon disminuyen su tamaño con cada división celular hasta alcanzar un tamaño crítico. En este punto, la reproducción sexual se produciría para restaurar el tamaño celular de la especie (Graham & Wilcox, 2000). En cada división vegetativa de *D. geminata*, los pedúnculos de las células quedan unidos conectando a las células clonales relacionadas (Kilroy, 2004). El tiempo de división de las diatomeas puede variar desde 0,3 a 5,0 días (Cox, 1999). A pesar de que la mayoría de las poblaciones son monoclonales, existe variabilidad dentro y entre las líneas celulares de las diatomeas y las poblaciones

CAPÍTULO I

1.2 *D. geminata*

1.2.2 Reproducción

(Mann, 1999) lo que dificulta identificar si la variación fenotípica tiene una base genética o es puramente una respuesta morfológica al medio ambiente (Stoermer & Julius, 2003).

La reproducción sexual no ha sido bien documentada para la especie. Si bien existen diferentes formas de reproducción sexual en diatomeas, es posible que *D. geminata* se reproduzca sexualmente de una manera similar a las diatomeas más cercanas filogenéticamente tales como *Cymbella* y *Gomphonema*. Las diatomeas pennales, por lo general, producen dos gametos ameboides del mismo tamaño (isogamia). Dos células madre se aparean dentro de un mucílago que se produce antes de que tenga lugar la meiosis (Canter-Lund & Lund, 1995). La fusión de dos núcleos haploides forma una auxospora. Cuando las condiciones son favorables, la auxospora germina y se divide por mitosis para formar una célula con valvas de tamaño restaurado (Graham & Wilcox, 2000). Las diatomeas de agua dulce pennadas pueden formar células de resistencia, que permiten la supervivencia en condiciones desfavorables. Esto podría ser importante si la concentración de silicato disuelto cae. Sin embargo, ninguna espora de resistencia ha sido observada en *D. geminata* (Graham & Wilcox, 2000). Meyer (1929) describió el ciclo de vida de una especie de *Didymosphenia* del Lago Baikal. Si bien él se refiere a la especie como *Didymosphenia geminata*, algunos autores como Skabitschewsky (1983) y Bishop (2014) ponen en duda la identificación ya que ciertas características morfométricas y morfológicas no coinciden con las descritas para la especie. Bishop (2014) demostró que, al menos las poblaciones estudiadas por él, muestran una restauración anual (reproducción sexual) aunque no pudo dilucidar el mecanismo específico a través del cual lo hacen.

1.2.3 Ecología.

Didymosphenia geminata crece tanto en ríos como lagos y es epífita o epilítica (Kilroy, 2004). Si bien los primeros registros de la especie sugieren que *D. geminata* tiene preferencias por cuerpos de aguas de altura, frías y oligotróficas (Spaulding & Elwell, 2007), los datos actuales indican que la especie no está confinada sólo a ese tipo de ambientes. Existe un acuerdo general con la opinión de Canter-Lund & Lund (1995) que postulan que lugares rocosos donde hay movimiento de agua, tales como ríos turbulentos y orillas de lagos, favorecen las floraciones de la especie. Recientemente, se han registrado floraciones de *D. geminata* en bajas altitudes, en aguas no tan frías, profundas y ricas en nutrientes, con flujos estables y controlados como son los ríos y arroyos aguas abajo de diques (Kelly, 2009). La regulación del flujo de agua, resultando en reducción de inundaciones y un flujo más constante, tiende a promover la acumulación de biomasa de *D. geminata* (Whitton *et al.*, 2009). Kirkwood y colaboradores (2007, 2008) mostraron una relación negativa significativa entre la biomasa

de *D. geminata* y la media de descarga ($r^2 = 0,30$) en los ríos Bow y Red Deer en el sur de Alberta, Canadá, y concluyeron que el régimen de flujo probablemente determina esto, más que la proximidad a las salidas de las presas. Probablemente los flujos estables contribuyen a la unión de las células de *D. geminata* al sustrato del cauce del río, lo que permitiría que la población se establezca y, posteriormente, las corrientes más rápidas mejorarían el suministro de nutrientes a las células, lo que facilitaría el crecimiento (Kilroy, 2004).

Las corrientes fuertes, como en períodos de grandes lluvias e inundaciones, pueden desprender y potencialmente reducir las proliferaciones de *D. geminata*, pero también pueden ayudar a su dispersión. La variación de la velocidad del flujo en los cursos de agua regulados puede ayudar a prevenir las floraciones masivas de *D. geminata* (Larned *et al.*, 2007), sin embargo algunos autores como Kawecka & Sanecki (2003) y Larson (2007) han observado que las floraciones de *D. geminata* se producen con más frecuencia en los ríos donde las presas regulan el flujo. Varios autores (Kirkwood *et al.*, 2007; Kolmakov *et al.*, 2008, entre otros) han señalado que las presas controlan otros factores además del flujo, tales como la modificación del régimen de temperatura y, en especial, la química del agua y las fracciones de nutrientes, ya que la represa libera al río el agua de profundidad. La química del agua es generalmente considerada un factor de control para la distribución y abundancia de diatomeas, particularmente las concentraciones de nutrientes y el pH (Spaulding & Elwell, 2007). Aunque las floraciones de *D. geminata* se producen con mayor frecuencia en aguas con bajo contenido de fósforo total ($<2 \mu\text{g/L}$) y bajo contenido de nitratos ($<1 \text{ mg/L}$), la especie también se puede encontrar, en general como planctónica, en ambientes donde ambos nutrientes están presentes en muy altas concentraciones (Spaulding & Elwell, 2007; Ladrera *et al.*, 2016). La capacidad de hidrolizar fósforo orgánico dentro de sus pedúnculos (especialmente para aguas con concentraciones de fósforo total bajos), es una ventaja de la especie frente a otras especies del perifiton (Ellwood & Whitton, 2007), y por lo tanto puede formar floraciones en ambientes con esas características. También se ha encontrado que *D. geminata* es capaz de atrapar fósforo entre las matas (Sundareshwar *et al.*, 2011). Esto explicaría por qué su estructura le permite que prospere en los ríos con bajo contenido de nutrientes, o con fluctuaciones importantes de los mismos (Ellwood & Whitton, 2007), mientras que otras algas sin esta capacidad están limitadas en su crecimiento (Beeby, 2012). Además, aparentemente, *D. geminata* también prefiere aguas con alto contenido de calcio (Lindstrøm & Skulberg, 2008).

Como fue mencionado anteriormente, los primeros registros de la especie mencionaban que se encontraba en aguas frías (Krammer & Lange-Bertalot, 1999) y donde las concentraciones de fósforo reactivo soluble (FRS) es $< 2 \mu\text{g/L}$ (Bothwell *et al.*, 2014). Actualmente, hay registros en sitios donde las temperaturas superan los 20°C y donde el FRS es $> 2 \mu\text{g/L}$. Por ejemplo, en la

Patagonia argentina se observó que, en general, la especie se encuentra en ambientes donde el FRS es menor o igual a 4 µg/L, siendo en uno de los sitios > 24 µg/L (Beamud *et al.*, 2016).

1.2.4 Distribución

Didymosphenia geminata fue descrita originalmente en base a materiales colectados en el Reino Unido (Cleve, 1894-1896) y fue hallada en Noruega, Escocia, Irlanda, Suecia, Finlandia, Francia, España, Suiza e Isla Vancouver (Kilroy, 2004). Hallazgos de *D. geminata* en hielo y otros sedimentos de varias áreas de Rusia (Polyakova & Stein, 2004; Miettinen *et al.*, 2005), Finlandia (Sarmaja-Korjonen & Alhonen, 1999) y América del Norte (Stoermer, 1993) sugieren que es nativa de esas áreas, en las que ha estado presente por lo menos en los últimos 8.000 a 120.000 años. Y sin embargo, la falta de estudios en otras regiones del mundo hace imposible establecer fehacientemente la distribución geográfica de la especie previa a la última década en la que ha desarrollado floraciones inusualmente conspicuas y abundantes en muchos países (Blanco & Ector, 2009; Whitton *et al.*, 2009). Se cree que la especie podría haberse establecido y dispersado recientemente en ríos y lagos de América del Norte (Kirkwood *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009), Europa (Kawecka & Sanecki, 2003; Blanco & Ector, 2008), Asia (Sherbot & Bothwell, 1993; Whitton *et al.*, 2009) y en el Hemisferio Sur (Kilroy, 2004; Segura, 2011; Sastre *et al.*, 2013) (Fig. 1).

En Asia, Metzeltin & Lange-Bertalot (1995) la registraron en el noroeste de Pakistán, Afganistán e Irán (Whitton *et al.*, 2009). En China hay varios registros siendo alguno de ellos en las Montañas Hengduan (Li *et al.*, 2003) y Everest (Li *et al.*, 2004). El primer registro de *D. geminata* en India fue en 2001 por Bhatt *et al.* (2008) en ríos del Himalaya, pero se sospecha que fue introducida no siendo nativa del lugar (Bhatt *et al.*, 2008). También hay registros de presencia del alga en el noreste de Turquía (Whitton *et al.*, 2009).

En América del Norte, Patrick & Reimer (1975) la reportaron solo en el Estado de Virginia y Spaulding & Elwell (2007) señalaron que las poblaciones se expandieron en América del Norte en los últimos años. Trabajos más recientes la registraron en los ríos en el oeste de Estados Unidos (Kocielek *et al.*, 2015). En Canadá, los primeros registros fueron para British Columbia (Lord, 1866), más tarde para el lago Okanaga (Clemens *et al.*, 1939), Lago Kootenay y Río Fraser (Ennis, 1975; Northcote *et al.* 1975 y Stein 1975 en Whitton *et al.*, 2009). En el mismo país, Stein & Borden (1979) la registraron como *Gomphonema acuminatum*. Actualmente las floraciones se están expandiendo a nuevas cuencas (se conocen registros para la cuenca de Alberta) consideradas como áreas prístinas (Whitton *et al.*, 2009).

En los países europeos, los informes son variables en relación a la expansión de *D.*

CAPÍTULO I

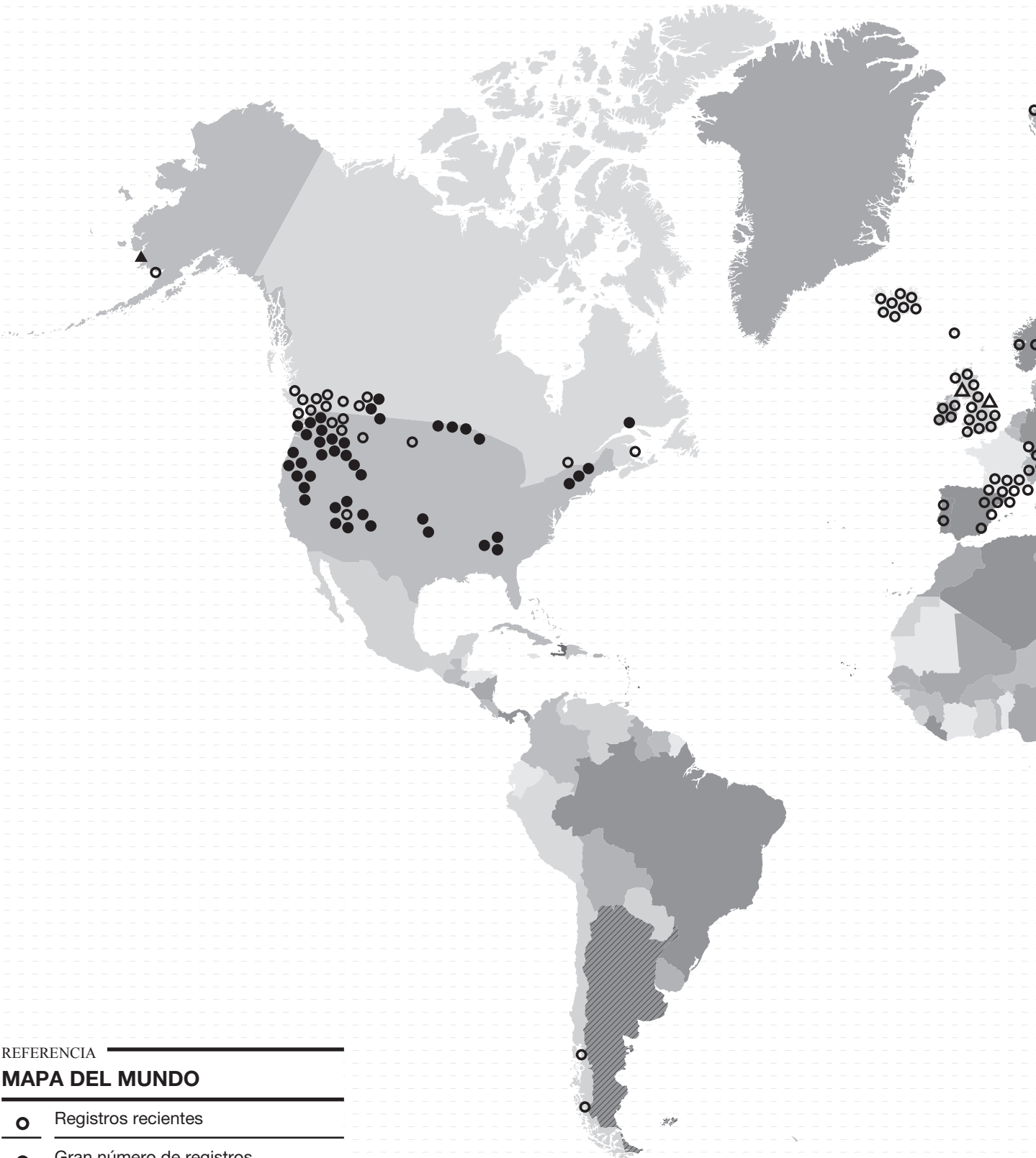
1.2 *D. geminata*

1.2.4 Distribución

geminata en los arroyos y ríos. En los ríos del norte y oeste del Reino Unido hay grandes floraciones de *D. geminata*, pero los crecimientos son considerados como un fenómeno natural ya que se han registrado por más de 150 años (Spaulding & Elwell, 2007). En el caso de Noruega, el primer registro data de 1868 por lo que también ha estado presente por al menos 150 años (Lindstrøm & Skulberg, 2008) siendo el río donde se encuentra presente, uno de los más importantes del país por la actividad de la pesca de salmónidos (Whitton *et al.*, 2009). En Italia, se conocen registros de la especie desde 1880 (Brun 1880 y Bonardi 1888 en Whitton *et al.*, 2009), y en los últimos años se la ha detectado en tributarios de la cuenca del Danubio al noreste de Italia. En Rusia, *D. geminata* tiene una amplia distribución siendo registrada en 27 de 66 ríos muestreados sólo una vez durante un corto período a finales del verano al noroeste del país (Whitton *et al.*, 2009). También fue una de las 12 diatomeas más comunes en la Laponia finlandesa (Komulainen, 2008 en Whitton *et al.*, 2009). Actualmente, hay registros en casi todos los países del norte de Europa y para la mayoría de los del sur (Whitton *et al.*, 2009; Blanco & Ector, 2008).

En 2004 se la encontró en Nueva Zelanda, siendo éste considerado erróneamente como el primer registro en el Hemisferio Sur (Kilroy 2004 en Spaulding & Elwell, 2007). Whitton y colaboradores (2009) señalan que fue registrada en Australia por Day *et al.* (1995) como *Gomphonema geminata* en un listado de algas de Watts de 1886. En Nueva Zelanda hay al menos un reporte en una lista de especies de algas de agua dulce realizado por Chapman *et al.* (1957) pero no se muestran fotografías ni se especifica número de colección. Aunque estos son estudios florísticos generales, y por lo tanto pueden haber errores, no hay razones por las cuales pueden ser cuestionados más que cualquier otro registro en la literatura clásica (Whitton *et al.*, 2009). En América del Sur la especie fue registrada por primera vez por Asprey y colaboradores (1964), siendo incluida por dichos autores entre las “especies muy raras”. No obstante, ellos estudiaron muestras planctónicas tomadas con una red de tramado muy grande, es decir que no se relevaron los ambientes en los que típicamente se encuentra el alga. El material original colectado por estos autores fue observado por el Dr. Brian A. Whitton, quien confirmó que la identificación taxonómica fue correcta (com. pers.). Rivera & Gebauer (1989) también registraron la especie en Chile pero no formando floraciones. En 2010 fue reportada nuevamente en la región patagónica formando proliferaciones masivas (Burgos González, 2010; Segura, 2011). El mismo año fue registrada por primera vez en la Argentina, en el Río Futaleufú, Provincia del Chubut (Sastre *et al.*, 2010). Desde ese año, las floraciones de *Didymosphenia* han ampliado su distribución, ocupando más de 20 ríos de cinco provincias argentinas (Uyua *et al.*, 2016). Sin embargo, no podemos estar seguros de que especies de este género no estuvieran presentes en la Patagonia Argentina, ya que los estudios previos sobre diatomeas (Vouilloud, 2003), son muy escasos y en general referidos al plancton.

Fig 1 / Mapa de distribución mundial de *D. geminata*
tomado de Whitton *et al.* (2009).



REFERENCIA	
MAPA DEL MUNDO	
○	Registros recientes
●	Gran número de registros
△	Frústulo Marino
▲	Fósil

Como fue mencionado anteriormente, *Didymosphenia geminata* es una diatomea de agua dulce (Blanco & Ector, 2009) con un alto poder invasivo. Esta especie coloniza rocas y en menor medida sustratos vivos (Lindstrøm & Skulberg, 2008). Posee un estadio de vida fijo, a través de pedúnculos, y un estadio planctónico, por lo cual se la puede encontrar en la columna del agua. En su fase fija, forma grandes matas mucilaginosas de color amarillo pálido a amarronado que cubren el lecho de los ríos cuando alcanza altas densidades, dando un aspecto desagradable a los cuerpos de agua y causando graves problemas ecológicos y económicos.

Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar el comportamiento invasivo de *D. geminata*, las cuales han sido recientemente discutidas por Watson y colaboradores (2015). Como se ha mencionado más arriba, Elwood & Whitton (2007) observaron que un factor importante en el crecimiento del alga podría ser su capacidad de hacer uso efectivo de fosfato orgánico. Dichos autores determinaron que las colonias presentan una muy alta actividad fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa, particularmente en la parte superior de los pedúnculos. Este fenómeno también ha sido estudiado por Aboal y colaboradores (2012). Por otro lado, en general la forma predominante de fosfato que se ha observado en los ríos con *D. geminata* es orgánica. Basados en esta evidencia y en varios aspectos de la forma en que el fosfato es liberado de la turba, Elwood & Whitton (2007) han presentado fuertes evidencias de que el incremento de las poblaciones de la especie ocurridas en los últimos años podría estar asociado con cambios climáticos globales que habrían conducido a incrementos en la liberación de fosfato durante la primavera. Otro indicio de la importancia del fosfato en la formación de pedúnculos fue provisto por Kilroy & Bothwell (2011), quienes observaron que luego de un periodo de enriquecimiento con nutrientes seguido por condiciones de carencia de los mismos, las tasas de división de *D. geminata* disminuyeron un 60%, mientras que el largo medio de los pedúnculos aumentó un 250%.

Cullis y colaboradores (2012) propusieron un modelo conceptual para explicar la dinámica de las invasiones de *D. geminata*. Ellos identifican cuatro estadios dinámicos que son la invasión inicial, crecimiento o respuesta de la invasión, remoción debido a un evento de disturbio y recolonización. Los autores plantean que para que se produzca una invasión a nuevos cursos de agua se debe dar la condición de un suministro adecuado de propágulos y un hábitat "ventana" para la supervivencia, definido a través de un conjunto de parámetros y umbrales que describen el potencial de *D. geminata* para sobrevivir y crecer en un río. Sin embargo, estos autores señalan que estos parámetros no son bien conocidos. El modelo propuesto por Cullis y colaboradores (2012) plantea que en la etapa de invasión el hombre es

CAPÍTULO I

1.2 *D. geminata*

1.2.5 Invasión, Colonización

un vector importante ya que la especie tiene la capacidad de permanecer viable por largos períodos de tiempo fuera del agua (al menos durante 5 días en condiciones húmedas y frías según Kilroy *et al.* (2007)). Esto le permitiría sobrevivir en embarcaciones y equipos de pesca que son trasladados a diferentes sitios del mundo. Además, Bus Leone y colaboradores (2014) reportaron que en Chile el visón americano (*Neovison vison*) es también un vector de dispersión a nivel regional y sugieren que los peces como los salmónidos pueden transportar las algas a través de los ríos durante los períodos de pre-desove. Sin embargo, Spaulding & Elwell (2007) señalan que también es posible que *D. geminata* estuviera presente pero en muy baja densidad en la mayoría de los hábitats donde actualmente se la encuentra y qué cambios ambientales recientes han favorecido las floraciones.

Cullis y colaboradores (2012) plantearon que la distribución espacial y temporal de las floraciones de *Didymosphenia* se puede describir mediante la identificación de valores de umbral crítico a condiciones ambientales cambiantes como temperatura y química (concentraciones de nutrientes) del agua, disponibilidad de luz y parámetros hidráulicos determinados por la variabilidad de flujo y las condiciones geomorfológicas específicas del sitio. En la actualidad, los parámetros que se conocen que determinan estos “hot spots” son la alta disponibilidad de luz (Sherbot & Bothwell, 1993; Whitton *et al.*, 2009), las bajas concentraciones de fósforo en el ambiente (Kilroy & Bothwell, 2011) y los bajos caudales (Kirkwood *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de estas condiciones no activa *per se* las floraciones, por lo que es probable que algún otro factor también influya en el desarrollo de las mismas. Además, Cullis y colaboradores (2012) plantean que la formación de grandes masas de mucilago altera las condiciones hidrodinámicas lo que favorece su persistencia. Estas grandes masas (producidas bajo condiciones de baja concentración de nutrientes y alta disponibilidad de luz) probablemente aumenten el transporte de nutrientes y potencialmente faciliten los procesos biogeoquímicos complejos y la retención de nutrientes dentro de las masas mucilaginosas creando un mecanismo de retroalimentación positiva para el crecimiento y producción de floraciones. Los autores de este modelo consideran que la clave para entender la paradoja de *D. geminata* (alta producción de biomasa en bajas concentraciones de nutrientes) es la independencia del crecimiento de la mata del crecimiento celular. La importancia de distinguir entre el crecimiento de las células y el crecimiento del pedúnculo de *D. geminata* se ha destacado, ya que están controladas por diferentes mecanismos biológicos (Cullis *et al.*, 2012). Experimentos controlados han demostrado que altos niveles de luz y baja concentración de nutrientes están asociados con el crecimiento del pedúnculo, mientras que concentraciones de nutrientes más altas están asociados con la división celular (Kilroy & Bothwell, 2011). Esta hipótesis se sustenta en estudios recientes llevados a cabo por Kilroy & Larned (2016), quienes observaron que el enriquecimiento con fósforo reduce o previene el desarrollo de matas de *D. geminata*, y que por

debajo de un determinado umbral de nitrógeno inorgánico disuelto (aprox. 10 mg/m³), no se producen grandes cantidades de mucílago y las divisiones celulares son limitadas. Se supone que el calcio y el silicato también son importantes para el crecimiento de *D. geminata* debido a los requisitos del pedúnculo (“cross-bridging”) (Gretz *et al.*, 2006) pero aún no está muy claro el rol que cumpliría el silicato.

Para la etapa de remoción, se considera que las inundaciones que movilizan los sustratos son el control primario sobre la eliminación de *D. geminata*. En particular, Cullis y colaboradores (2012) propusieron que existe un valor crítico del esfuerzo específico del sitio necesario para el corte de las matas que es responsable de la mayor parte de la remoción de biomasa. La determinación de los umbrales críticos para la eliminación de las matas producidas requiere de información hidrológica y geomorfológica específica del sitio, así como una mejor comprensión de la retroalimentación entre la formación de las floraciones y las condiciones hidrodinámicas. Por encima de este valor crítico, es probable que se produzca la retirada de las células muertas y las matas. Además, estos autores observaron que la magnitud de la eliminación de la biomasa también se verá influenciada por la cantidad de material extraíble (biomasa en pie). En general, la cantidad perdida en una inundación depende de la intensidad de la crecida y la resistencia de las comunidades de perifiton (Biggs & Close, 1989). Dada la fuerte capacidad de fijación de *D. geminata* (Kilroy, 2004), se espera que la magnitud de inundación requerida sea alta.

1.2.6 Impacto

El escaso conocimiento sobre la biología y ecología de esta especie dificulta la determinación de impactos a largo plazo en los ambientes en los que persiste. Varios estudios han demostrado que es probable que *D. geminata* tenga un impacto significativo en las especies autóctonas y la biodiversidad (Campbell, 2005; Kilroy *et al.*, 2006; Spaulding & Elwell, 2007; Gillis & Lavoie, 2014); aunque otros autores como Sivarajah y colaboradores (2015) sugieren que las floraciones de *D. geminata* tienen poco impacto mensurable sobre la composición del ensamblaje de diatomeas bentónicas en ríos. Entre los efectos nocivos, además del deterioro del paisaje, pueden mencionarse los causados por las matas que atrapan sedimentos finos y cambian la naturaleza de los sustratos naturales modificando el hábitat de las comunidades algales y de macroinvertebrados; perjuicios en las comunidades de peces por la obturación de agallas y alteración del hábitat por limitar los invertebrados de los que se alimentan; taponamiento en las tomas de agua para uso doméstico o acuicultura (Kilroy, 2004), entre otros. Si bien en ríos de Noruega, Inglaterra y otros países de Europa no se han visto impactos negati-

vos sobre las comunidades de peces donde se desarrollan floraciones del alga (Whitton *et al.*, 2009), en Estados Unidos y España se han observado cambios en las comunidades algas y de invertebrados en ríos afectados por las floraciones de *D. geminata* (Sanmiguel *et al.*, 2016; James & Chips, 2016). Además, en áreas con alta biomasa de *D. geminata*, pueden observarse fluctuaciones significativas diurnas de oxígeno disuelto (OD). En el Hemisferio Norte se ha observado que, durante el comienzo del otoño, la floración comienza a descomponerse dando lugar a una depresión sustancial de OD que ocurre particularmente durante los bajos flujos de verano seguidos por las últimas lluvias del otoño. Esto a su vez, produce cambios de pH en los ríos siendo problemático para peces y camarones nativos, que son sensibles a estos cambios (Kelly, 2009).

1.3 Taxonomía y Clasificación de diatomeas (Bacillariophyceae)

Los estudios realizados sobre el origen del eucariota fotosintéticos inicial indican que ha implicado la captación fagotrófica de una cianobacteria por una célula huésped heterotrófica y su conversión en organela permanente dentro de la célula (Medlin, 2016). Este proceso se denomina endosimbiosis y se piensa que ha tenido lugar en dos etapas. La endosimbiosis primaria, que involucra a un huésped heterotrófico y a una cianobacteria, se cree que sólo ha ocurrido una vez, dando lugar al linaje de las algas verdes, las algas rojas y las algas glaucófitas (Bhattacharya & Medlin, 1995 en Medlin, 2016). Después de este evento, habría ocurrido un evento endosimbiótico secundario, en el que una de las algas endosimbióticas primarias fue engullida por un segundo huésped heterotrófico. Si el alga engullida fue un alga verde, entonces la nueva célula eucariota se convirtió en un alga euglenoide o clorarachniófito. Si la célula engullida fue un alga roja, entonces la nueva célula eucariota resultante se convirtió en una criptofita, haptofita, heterokonta o un dinoflagelado. Está claro que estos eventos no ocurrieron solo una vez, ya que el registro fósil muestra la aparición de los distintos linajes en distintas épocas (Medlin, 2016).

Dentro de los heterocontas, las células parecen haber perdido el plástido de su endosimbiosis secundaria (Medlin, 2016). Además, hay una divergencia final dentro de este linaje de todas las algas autótrofas doradas y pardas, que incluye a las diatomeas (Medlin, 2016). A través de estudios de la ultraestructura, también se pudo establecer la relación entre las heterocontas y las diatomeas (Medlin *et al.*, 1997). Las algas heterocontas poseen clorofila a y c, y presentan zooides con dos flagelos diferentes: uno pleuronematado con mastigonemas tripartitos y el otro liso. En las diatomeas, el aparato flagelar está reducido o ausente; de hecho, sólo los espermatozoides de las diatomeas 'céntricas' son flagelados y estos son uniflagelados,

careciendo de todo rastro de un flagelo posterior liso o cuerpo basal. Sin embargo, este flagelo presenta mastigonemas tripartitos característicos del grupo. Asimismo, la ultraestructura de los plástidos con cuatro membranas, lamelas tritilacoidales, nucleóide en forma de anillo periférico y la composición pigmentaria, concuerdan con las de las heterocontofitas (Sims *et al.*, 2006).

Las primeras clasificaciones de diatomeas se basaron en el registro fósil y las características morfológicas y morfométricas del frústulo (Kelly, 2009). Round y colaboradores (1990) dividieron a las diatomeas en “centrales” (Coscinodiscophyceae) y “pennadas”, y dentro de éste último grupo en pennadas arafideas (Fragilariophyceae) y pennadas con rafe (Bacillariophyceae). Sin embargo, características como reproducción y estructuras de los plástidos sugerían que no eran grupos monofiléticos, confirmando esta suposición estudios moleculares posteriores (Medlin *et al.*, 1996).

El primer registro fósil de diatomeas es del Cretácico Inferior (Hardwood & Gersonde, 1990 en Julius, 2007) aunque autores como Julius (2007) colocan a los fósiles descritos por Rothpletz en 1986 en el período Jurásico. Por otro lado, las estimaciones hechas con reloj molecular, sugieren que aparecieron hace 250 millones de años (Sims *et al.*, 2006). Una de las dificultades en la reconstrucción de la historia filogenética de las diatomeas es la longitud del largo de rama, causada por el largo tiempo desde la divergencia de las especies existentes de sus ancestros comunes. Muchas especies sólo existen en el registro fósil perdiéndose la información relevante para entender la historia de las diatomeas (Williams, 2007).

Dentro de las diatomeas, existe un patrón de evolución consistente con el registro fósil que sugiere que las especies con simetría radial evolucionaron primero, seguidas por las especies no radiales sin un esternón central (Kociolek *et al.*, 2015). De aquellos con esternón central (diatomeas pennadas bilateralmente simétricas), muchos linajes de diatomeas no rafideas evolucionaron primero, y fue un único evento posterior que dio lugar a las diatomeas con rafe (Kociolek *et al.*, 2015).

Como resultado de un estudio detallado sobre morfología, citología y datos moleculares de 100 taxones, Medlin & Kaczmarska (2004) proponen dividir las diatomeas en dos Subphylum: Coscinodiscophytina (céntricas radiales) y Bacillariophytina, éste último dividiéndose en dos clases: la Clase Bacillariophyceae (pennadas) y Mediophyceae (céntricas polares) (Fig. 2). Basándose en 126 secuencias de SSU rARN, Sorhannus (2004) dividió en seis clados a las diatomeas céntricas (incluyendo tres clados para las de simetría radial y tres clados para las céntricas bipolares), dos para las arafideas y tres clados para las rafideas. Sin embargo, varios autores han argumentado que estas clasificaciones no reflejan la filogenia, cuestionando específicamente la monofilia de las diatomeas céntricas radiales y polares (Mann & Evans, 2007; Williams & Kociolek, 2007; Theriot *et al.*, 2009). Williams & Kociolek (2007) afirman que toda la

clasificación actual de diatomeas se basa en grupos parafiléticos por lo que la filogenia debe ser revisada. En consecuencia, el sistema de clasificación de diatomeas es objeto de debate y varios sistemas están actualmente en uso.

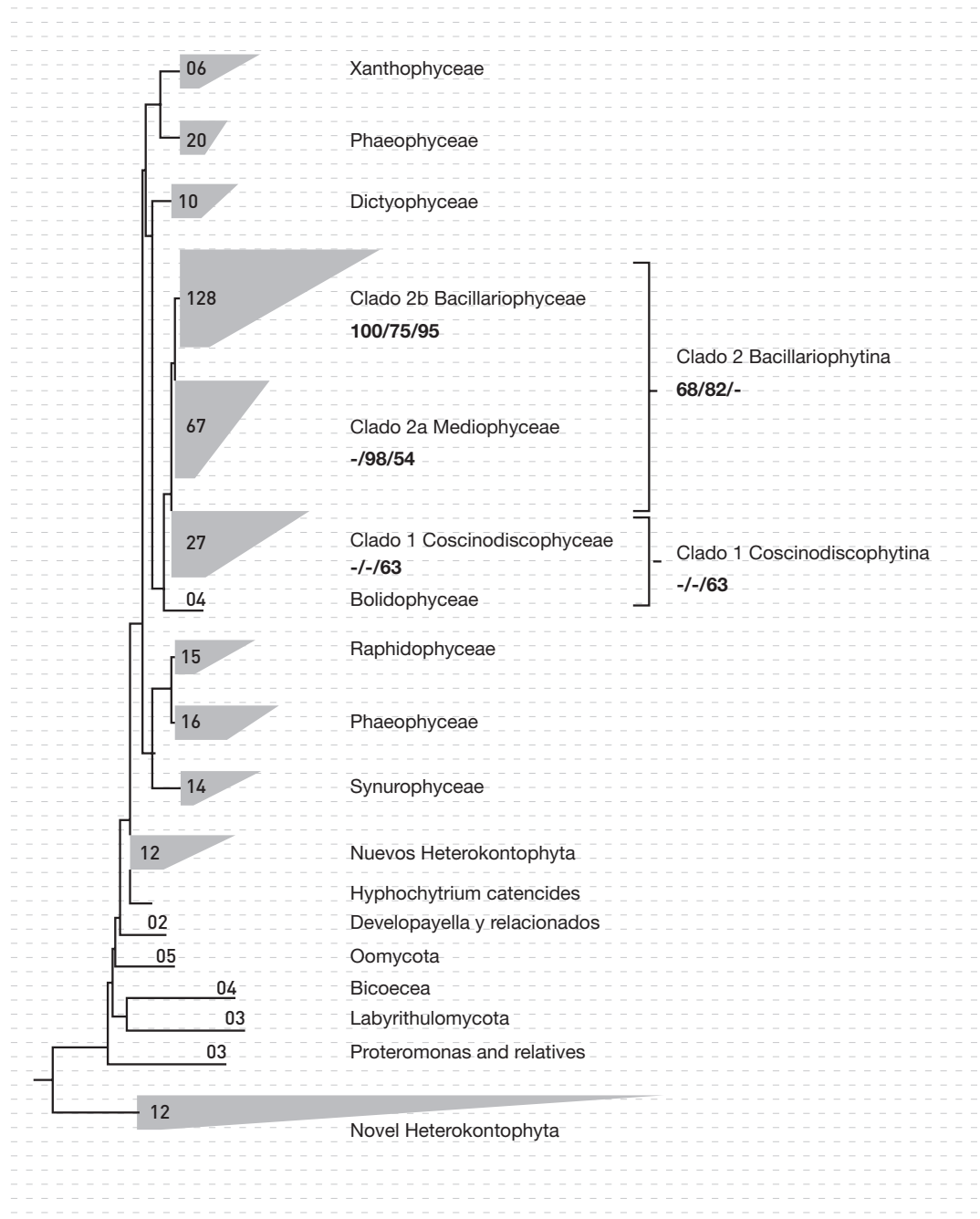
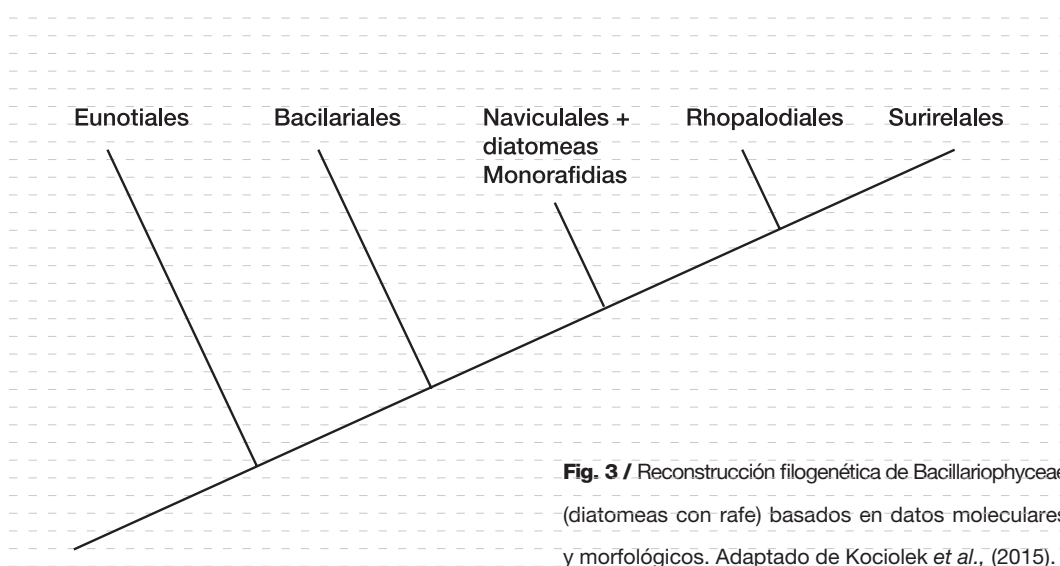


Fig. 2. Reconstrucción filogenética de Heterokonta mostrando los mayores clados de diatomeas usando parsimonia y la base de datos ARB de 9000 secuencias de subunidades pequeñas (SSU) de ADN ribosomal (rADN). Los números para las clases y subdivisiones de diatomeas representan la probabilidad posterior y los valores de *bootstrap* para los análisis de *neighbour-joining* y máxima parsimonia. Tomado de Sims *et al.* 2006.

1.3.1 Taxonomía y Clasificación de *Didymosphenia*

Didymosphenia geminata (Lyngbye) M. Schmidt fue descrita por primera vez como *Echinella geminata* Lyngbye en las Islas Feroe (Lyngbye, 1819 en Dawson, 1973a). Posteriormente fue denominada *Gomphonema geminatum* (Lyngbye) Agardh 1824 (Dawson, 1973a). En 1899, Martin Schmidt (en el Atlas der Diatomaceen-Kunde de Adolf Schmidt) transfiere a *G. geminatum* como *Didymosphenia geminata* al nuevo taxón *Didymosphenia*, considerado un subgénero de *Gomphonema* (Dawson, 1973a). Hasta ese momento, *Didymosphenia* incluía tres especies y una variedad, las cuales habían sido previamente consideradas como variedades de *Gomphonema geminatum* (Lyngb.) C. Ag. (Dawson, 1973b). Los taxones en este nuevo subgénero eran *D. geminata* (Lyngb.) M. Schmidt, *D. geminata* var. *stricta* M. Schmidt, *D. curvirostra* (Temp. Et Brun) M. Schmidt y *D. sibirica* (Grun.) M. Schmidt. Schmidt (1899) señaló que aunque *Didymosphenia* mostraba algunas características del género *Gomphonema*, también poseía características que la separaban. Posteriormente, *Didymosphenia* fue elevado al estatus de Género por Hustedt en 1930 (Dawson, 1973a).

Actualmente, el género *Didymosphenia* se ubica en la Clase Bacillariophyceae Haeckel que incluye a las diatomeas que poseen un sistema de rafe (Fig. 3). El rafe es considerado una innovación evolutiva ya que la presencia de una ranura en una o en las dos valvas le confiere movilidad al individuo (Round *et al.*, 1990). Las diatomeas con rafe son un grupo altamente diverso, con más de 10.000 especies (Fourtanier & Kociolek, 2011 en Kociolek *et al.*, 2015). Esta gran diversidad puede deberse a los muchos nichos que resultan disponibles por la habilidad del grupo para moverse. Este grupo de diatomeas ha explotado muchos hábitats, y tiene un amplio espectro de tolerancias a la salinidad, temperatura, contaminación y sustrato (Kociolek, 2007).



CAPÍTULO I

1.3 Taxonomía y
Clasificación

1.3.1 Taxonomía y
Clasificación

Dentro de las Bacillariophyceae, inicialmente *Didymosphenia* fue considerada dentro de la Familia Gomphonemataceae. Sin embargo, Kociolek & Stoermer (1988) postularon que *Didymosphenia* estaba más relacionada con los géneros *Cymbella* y *Encyonema* que con *Gomphonema* y *Gomphoneis*. Esta postura está soportada por ciertas características ultraestructurales como las posiciones relativas del núcleo, pirenoides y cromatóforo y, la aparición del diatotepum (Moffat, 1994). Las Familias Cymbellaceae y Gomphonemataceae poseen campo apical de poros, asimetría con respecto al eje apical y otras características similares, incluyendo varias características citoplasmáticas (Kociolek & Stoermer, 1989). Sin embargo, dentro de la familia Gomphonemataceae, el campo de poros está atravesado por la fisura terminal del rafe. Análisis cladísticos de caracteres citológicos y morfológicos del frústulo mostraron paralelismo entre la evolución de *Didymosphenia* y la Familia Gomphonemataceae (Kociolek & Stoermer, 1988b). Por lo tanto, *Didymosphenia* es considerada un miembro de las diatomeas cymbelloides, en lugar de su inclusión previa con taxones gomphonemoides (Kociolek *et al.*, 2015) (Fig. 4). El descubrimiento de la convergencia evolutiva en la asimetría ha conducido a cambios en la clasificación de algunos géneros (Kociolek & Stoermer, 1988b; Kociolek, 1998).

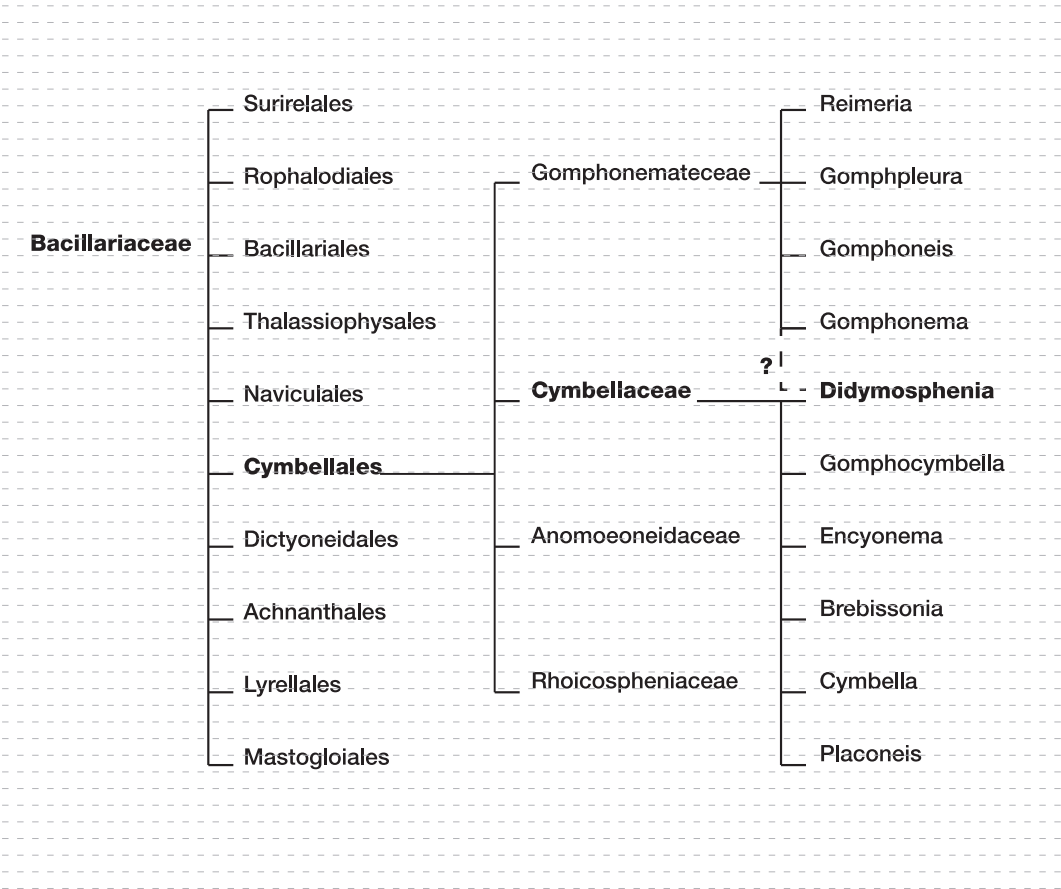


Fig. 4 / Clasificación simplificada del grupo Bacillariophyceae extraído de Round *et al.*, (1990).

CAPÍTULO I

1.3 Taxonomía y Clasificación

1.3.1 Taxonomía y Clasificación

Las Cymbellales son un grupo de diatomeas rafideas, en su mayoría de agua dulce, que comprenden 28 géneros y más 1100 especies (Guiry & Guiry 2013 en Nakov *et al.*, 2014).

Los géneros dentro de los Cymbellales varían con respecto a la simetría de la valva (simétrica, en forma de luna, clavada), hábito de crecimiento (vida libre, bentónica, en tubos) y modo de reproducción sexual (isogamia, anisogamia) (Nakov *et al.*, 2014). Algunos de los caracteres que comparten *Cymbella sensu stricto* y *Didymosphenia* es la ubicación ventral de los estigmas y el núcleo, la ubicación dorsal del pirenoides y la terminación distal externa del rafe curvada dorsalmente. Según Krammer y colaboradores (2011), basados en datos obtenidos del gen 18S ADNr, *D. geminata* posee como taxones hermanos a especies del género *Cymbella*, siendo este último parafilético, ya que dentro de este clado se encuentran presentes especies de los géneros *Cymbopleura*, *Cymbella* y *Didymosphenia*.

En 1995 Metzeltin & Lange-Bertalot describieron 5 especies de *Didymosphenia* entre ellas *D. geminata* con tres morfotipos: *D. geminata sensu stricto*, *capitata* y *subcapitata*, *D. siberica*, *D. curvata*, *D. clavaherculis* y *D. pumila*, no considerando como una especie a *D. dentata* Dorogostaisky *sensu* Skvortzow & Meyer. Otras especies descritas son *D. curvirostrum* (Tempère & Brun) M. Schmidt, *D. neocaledonica* Manguin, *D. lineata* Skabichevsky, *D. dentata* Dorogostaisky, la especie fósil *D. fossilis* Horikawa & Okuno y *D. tatrensis* Mrozińska (Mrozińska *et al.*, 2006). En 2014, Metzeltin & Lange-Bertalot realizaron una revisión del género *Didymosphenia* reconociendo 22 especies y una subespecie de *D. geminata* definidas sobre la base de características morfológicas. Estos autores dividieron al género en cuatro clusters. El primer cluster está compuesto de 8 (o 9) taxones alrededor de la especie tipo *D. geminata* caracterizado por poseer la cara externa de la valva “rugosa”, ornamentación con un patrón prominente de perforaciones poco profundas y pequeñas espinulas y, un borde silíceo entre la cara valvar y el manto que termina en espinas apicales. Este cluster incluye a: *D. geminata*, *D. clavaherculis*, *D. clavamagna*, *D. coronata*, *D. dorogostaiskyi*, *D. laticollis*, *D. strelnikovae* y probablemente *D. lineata*. El segundo cluster comprende 9 taxones, todos ellos con una superficie valvar “lisa”, como *D. tatrensis*, y no poseen ornamentación alrededor de la areola ni tampoco borde marginal (o este está muy poco desarrollado). Con frecuencia se observan espinas apicales, contorno valvar y areolas con detalles variables. En este grupo se incluye a: *D. crassiporata*, *D. curvata*, *D. grunowii*, *D. laticeps*, *D. mongólica*, *D. pumila*, *D. skvortzowii*, *D. siberica*, *D. tatrensis*. Un tercer cluster está formado por especies fósiles de Japón: *D. fossilis* y *D. nipponica*, de contorno valvar más lanceolado que claviforme. *D. curvirostrum*, igualmente especie fósil de Japón, es claviforme y simétrica con respecto al plano apical; es rara y la estructura fina no se conoce. El último cluster está formado por dos especies del Lago Baikal: *D. dentata* y *D. subcapitata*. Ambas se caracterizan por una única combinación de caracteres: espinas marginales regulares fuertemente desarrolladas, ausencia de borde marginal y, una

CAPÍTULO I

1.3 Taxonomía y Clasificación

1.3.1 Taxonomía y Clasificación

superficie valvar semejante a la de *D. geminata* y taxones relacionados. El velo tipo *volae* no forma un complejo dendrítico pero posee grandes aperturas semicirculares alrededor de un proceso de forma de solapa (labio). No presenta estigma o estigmata en el área central.

Otros autores, como Guiry & Guiry (2017), reconocen menos taxones dentro del género, entre los que se encuentran: *Didymosphenia clava-herculis* (Ehrenberg) Metzeltin & Lange-Bertalot, *Didymosphenia curvata* (Skvortzov & Meyer) Metzeltin & Lange-Bertalot, *Didymosphenia dentata* (Dorogostaisky) Skvortzov & K.I.Meyer, *Didymosphenia geminata* var. *neocaledonica* E. Manguin, *Didymosphenia geminata* var. *baicalensis* Skvortzov & Meyer, *Didymosphenia geminata* var. *dorogostaiskyi* Skvortzov & Meyer, *Didymosphenia grunowii* Lange-Bertalot & Metzeltin, *Didymosphenia hullii* Khan-Bureau, *Didymosphenia laticollis* Metzeltin & Lange-Bertalot, *Didymosphenia pumila* Metzeltin & Lange-Bertalot, *Didymosphenia tatrensis* Mrozinska, Czerwik-Marcinkowska & Gradzinski.

La sistemática de las especies del género *Didymosphenia* no está resuelta aún y podría ser más compleja de lo esperado porque se ha observado mucha variabilidad morfológica dentro de las poblaciones y entre poblaciones de diferentes regiones del mundo. Además, recientemente se ha comenzado aplicar el uso de técnicas moleculares para resolver los conflictos taxonómicos y filogenéticos que existen dentro del género. Por ejemplo, producto del uso de estas técnicas Khan-Bureau y colaboradores (2016) describieron una nueva especie para el género: *Didymosphenia hullii* Khan-Bureau.

1.4 Objetivo

El Objetivo general de este trabajo es comprender la dinámica de la invasión de *Didymosphenia* en la Provincia del Chubut y las vías de diseminación y colonización de la especie en ambientes dulceacuícolas patagónicos.

1.4.1 Objetivos particulares

- Establecer de manera fehaciente la identidad de la o las especies del género *Didymosphenia* presentes en la Patagonia argentina a través de análisis morfológicos y moleculares.
- Obtener material genético (ácidos nucleicos) a partir de muestras tomadas a campo.
- Evaluar cuál es la técnica de extracción de material genético óptima para llevar a cabo estudios moleculares en esta especie.
- Evaluar la posibilidad de utilizar tres marcadores genéticos para su detección a nivel molecular.

CAPÍTULO I

1.4 Objetivo

1.4.1 Objetivos particulares

- Establecer la distribución geográfica de *Didymosphenia* en las cuencas de la región Andina pertenecientes a la Provincia del Chubut.

- Establecer el origen de la invasión local así como sus patrones de dispersión a nivel regional y comparar con los patrones observados en otras partes del mundo.

1.5 Hipótesis

En este trabajo nos hemos planteado dos hipótesis alternativas que permitirían explicar la expansión geográfica a nivel local y mundial de *Didymosphenia geminata*:

Las floraciones de *Didymosphenia* en Argentina son producto de una o más introducciones favorecidas por la capacidad de la especie de permanecer viable fuera del agua por largos periodos de tiempo siendo el hombre el principal vector de dispersión.

Hasta el presente, esta hipótesis es considerada como una de las mejores explicaciones para la expansión geográfica de *Didymosphenia geminata* a nivel mundial y regional (Kilroy, 2005c). Sin embargo, aunque sólo en dos citas puntuales para Chile la especie fue reportada en la década del '60 y '80 en América del Sur, hasta ese momento, la especie no producía las floraciones que se registran en la actualidad, por lo que nos planteamos una hipótesis alternativa:

Las floraciones de *Didymosphenia geminata* responden a cambios ambientales globales que han favorecido la expansión de cepas locales de la especie.

CAPÍTULO II

Morfología valvar del género
Didymosphenia en la Patagonia
Sur Argentina.

MORFOLOGÍA VALVAR DEL GÉNERO *DIDYMOSPHENIA* EN LA PATAGONIA SUR ARGENTINA.

2.1. Introducción

La historia de la diatomea *Didymosphenia geminata* como una especie invasora que forma floraciones en el Hemisferio Norte, se ha documentado desde hace más de 20 años (Bothwell *et al.*, 2014). Luego de que la Patagonia fuera incluida en un mapa de zonas vulnerables publicado por McNyset y Julius en Spaulding & Elwell (2007) y que fuera hallada formando floraciones en Chile a principios de 2010, se comenzaron a realizar monitoreos en Argentina. Fue a fines de ese mismo año cuando se la registró en nuestro país, formando floraciones en el Río Futaleufú en la Provincia del Chubut (Sastre *et al.*, 2013). En Chile, en solo un año se confirmó su presencia en 20 ríos distribuidos en más de 800 km (Reid *et al.*, 2012). En Argentina, aunque los primeros reportes se limitaron a la provincia del Chubut (Sastre *et al.*, 2010), la especie se propagó de norte a sur de la Patagonia en un breve periodo de tiempo (Beamud *et al.*, 2013; Uyua *et al.*, 2016).

A pesar de que en Argentina no había registros previos del alga hasta 2010, Asprey *et al.* (1964) y Rivera & Gebauer (1989) la mencionaron en Chile unas décadas antes. En una revisión de la flora de diatomeas chilenas, estos últimos autores confirmaron la presencia de *D. geminata* en Mejillones (Región de Antofagasta), Lago Sarmiento (Región de Magallanes) y Río Cisnes (Región de Aysén). En Argentina la especie no se registró hasta 2010 (Vouilloud, 2003 y otras publicaciones posteriores al 2004; Sastre *et al.*, 2013). Sin embargo, teniendo en cuenta que la información básica en el país es escasa, es posible que la especie estuviera presente en poblaciones pequeñas o que se haya introducido desde Chile en los últimos años. Nativa o exótica, el problema en la Patagonia argentina es que la especie está aumentando rápidamente su área colonizada.

Como un primer paso para entender el problema en la Patagonia, fue necesario identificar fehacientemente el taxón que forma las floraciones en la región. Como fue mencionado anteriormente, existe mucha variación dentro y entre las poblaciones de *D. geminata* de las diferentes regiones del mundo (Whitton *et al.*, 2009). Algunos autores como Antoine y Benson-Evans atribuyen esas diferencias a formas teratológicas o que, en el caso de más de un hallazgo de una estructura “especial”, puede deberse a variación genética (Whitton *et al.*, 2009). Las poblaciones de América del Sur de esta diatomea fueron analizadas con micros-

copía electrónica por primera vez por Rivera y colaboradores (2013) pero su micromorfología valvar no fue comparada con el de poblaciones de otras regiones del mundo.

Los objetivos de este capítulo son: (i) identificar y caracterizar, a través análisis morfológicos y morfométricos, las poblaciones de *Didymosphenia* que han colonizado recientemente la región Patagónica Argentina, con especial énfasis en la provincia del Chubut, (ii) establecer la identidad de las poblaciones de las diferentes regiones de la Patagonia argentina, (iii) establecer la procedencia de las poblaciones argentinas, a través de la comparación de las diferentes poblaciones con las presentes en regiones cercanas como Chile y con regiones más alejadas como Estados Unidos, Nueva Zelanda, entre otros.

Ésta información es básica para mejorar las medidas de control en el área de estudio tendientes a reducir los daños ocasionados por esta diatomea invasora.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1 Área de estudio

Las muestras analizadas fueron colectadas en las provincias del Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego.

En Chubut, donde se realizaron los primeros hallazgos del alga, el muestreo fue exhaustivo, abarcando 5 cuencas a lo largo de 5 años. Parte de estas muestras fueron recolectadas en el marco del programa de monitoreo llevado a cabo por el Ministerio de Ambiente y Control de Desarrollo Sustentable (MAyCDS), la Secretaría de Pesca de la Provincia del Chubut y la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB) Sede Trelew y Esquel (Sastre *et al.*, 2010a; Sastre *et al.*, 2010b; Bauer *et al.*, 2011; Sastre *et al.*, 2011; Sastre *et al.*, 2012a; Sastre *et al.*; 2012b). Dado que los primeros hallazgos del alga fueron en la región Noroeste de la provincia del Chubut, los análisis morfológicos se realizaron en un área comprendida en esta región (Fig.5).

Para este análisis se evaluaron los sitios con presencia del alga (se revisaron más de 30 muestras recolectadas hasta ese momento) y se hizo una revisión al microscopio óptico con el fin de seleccionar tres sitios como representativos de la provincia. Los sitios seleccionados fueron los ríos Futaleufú y Rivadavia, pertenecientes a la subcuenca baja y media Austral y Oriental de la cuenca Futaleufú y el Río Azul perteneciente a la cuenca del Lago Puelo. Las muestras fueron recolectadas durante la primavera de 2010 y, otoño y primavera de 2011 en el Río Futaleufú y durante la primavera de 2012 para los ríos Rivadavia y Azul (ya que estos río fueron colonizados entre el 2011 y 2012). Todos los sitios fueron localizados con un sistema de posicionamiento global (GPS). A medida que *Didymosphenia* fue colonizando nuevos sitios

CAPÍTULO II

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Área de estudio

dentro de la Provincia, se fueron analizando las muestras para comparar la morfología y morfometría entre los distintos sitios.

De cada sitio seleccionado, se recolectaron 2 muestras multihábitat de perifiton con pinzas previamente desinfectadas de rocas de diferentes tamaños, plantas y macroalgas sumergidas y emergentes, abarcando una superficie de 50 m² aproximadamente tratando de que se encuentren representados distintos estadios de desarrollo de las colonias. Cada muestra se colocó en un recipiente plástico de 500 ml y fueron fijadas en alcohol 70% para su utilización en los estudios microscópicos.

En el Río Futaleufú las muestras se colectaron en diferentes épocas del año a fin de analizar la variación morfológica de la especie a largo del ciclo anual.

En todos los casos los muestreos se realizaron siguiendo las pautas de seguridad recomendadas a nivel nacional e internacional considerando que se trata de una especie invasora (Duncan *et al.* 2007; Casco & Sala, 2011).

Asimismo, se analizaron muestras provenientes del Río Grande (Provincia de Tierra del Fuego) y Río de las Vueltas (Provincia de Santa Cruz) que fueron provistas por la Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente y la Subsecretaría de Pesca respectivamente (Fig. 6).

Fig. 5 / Área de estudio en la provincia del Chubut.



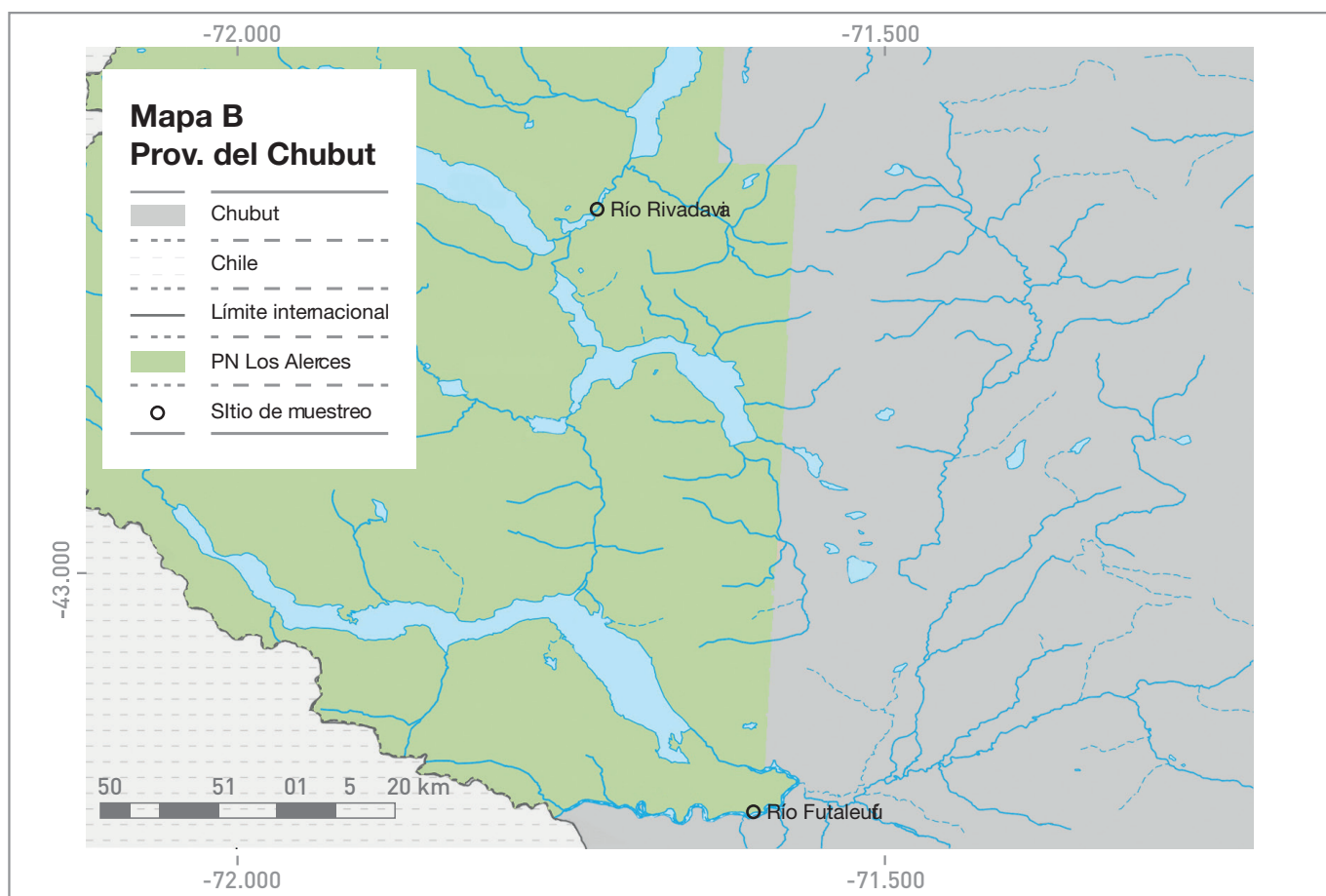
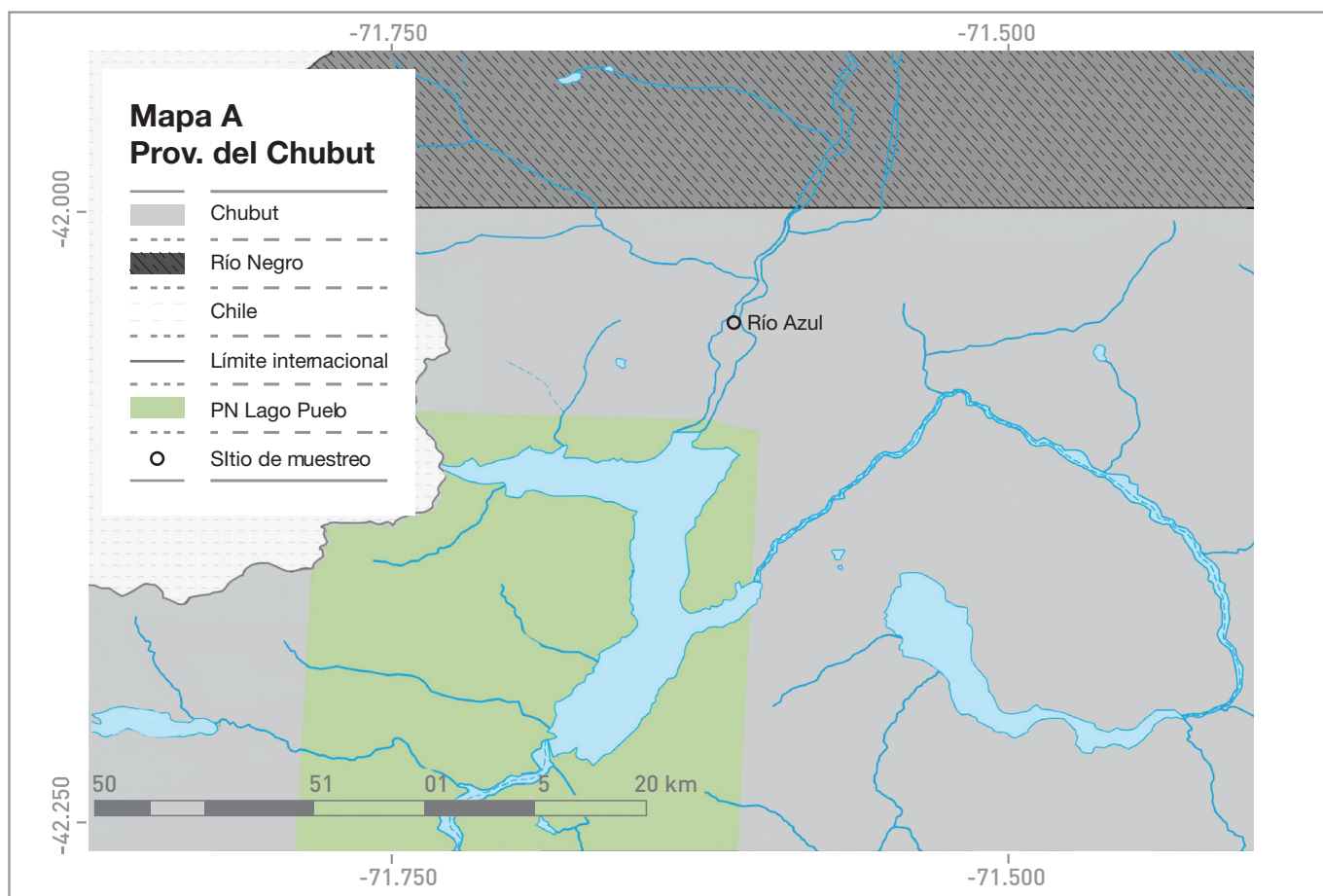
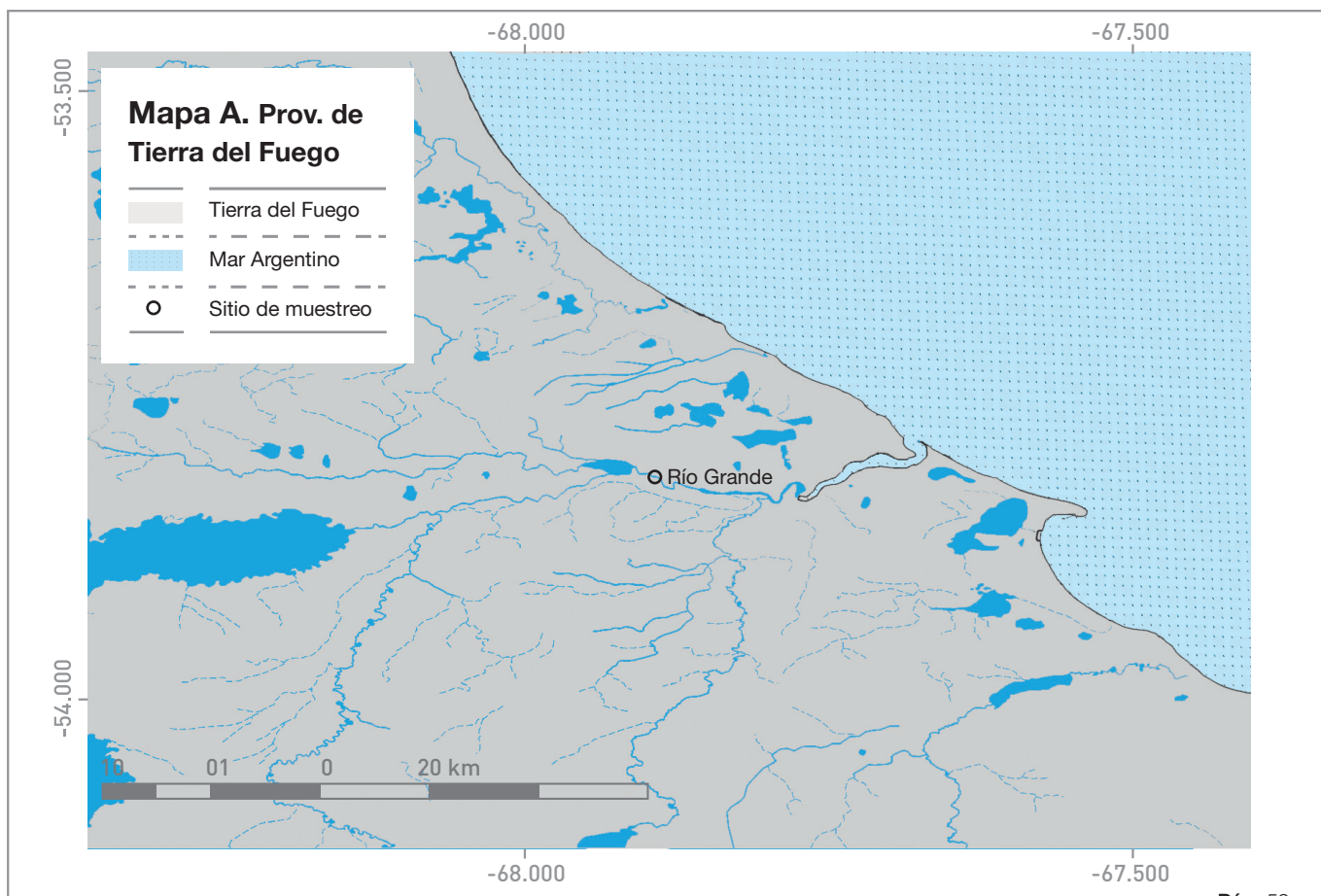
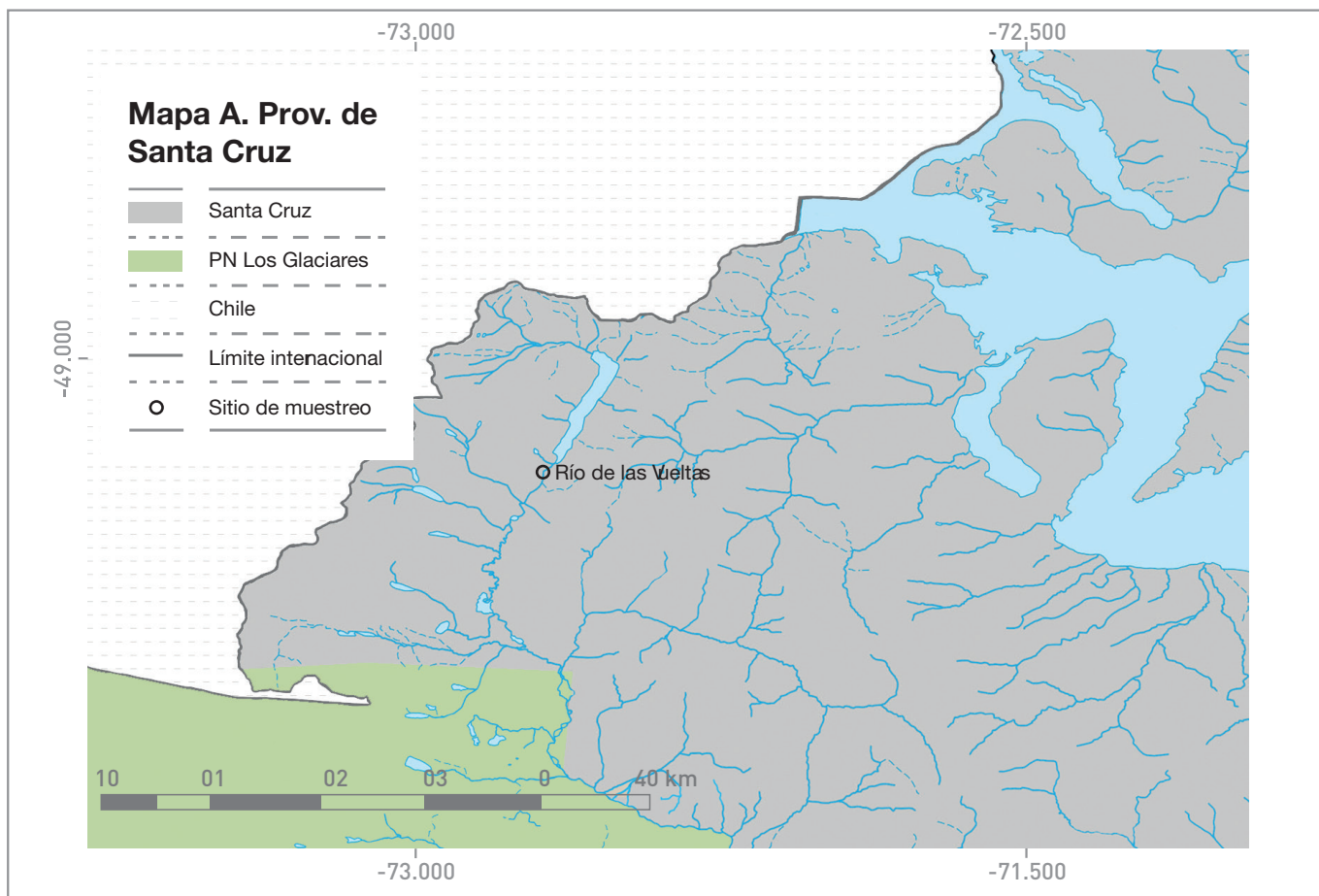


Fig. 6 / Área de estudio en las provincias de Santa Cruz y Tierra del Fuego.





2.2.2 Análisis morfológico mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (MEB)

Para el análisis microscópico las muestras de perifiton fueron tratadas siguiendo el protocolo de Hasle & Frixell (1970). Para el análisis con MO, las muestras fueron montadas en Naphrax® y analizadas con un microscopio Olympus CKX41 con contraste de fases y fotografiadas con una cámara Olympus Evolt E-330. Para su observación al MEB las muestras fueron montadas sobre tacos de vidrio de 1 cm² y metalizadas con oro en un metalizador JEOL JFC-1100. Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio Jeol JSM-6360L del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata.

Las muestras tratadas y no tratadas y los preparados permanentes fueron depositados en el Herbario del Museo de La Plata (LPC) y una copia en el Instituto de Hidrobiología de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. A continuación se detallan los datos de muestras utilizadas para el análisis con microscopio electrónico bajo los siguientes números:

LPC 13400: Río Futaleufú, Latitud 43° 10' 23.4" S, Longitud 71° 35' 41.1" O; Provincia del Chubut, Argentina; Septiembre 2010. Colector: Gabriel Bauer.

LPC 13401: Río Futaleufú, Latitud 43° 10' 24.2" S, Longitud 71° 35' 39.9" O. Provincia del Chubut, Argentina. Marzo 2011. Colector: Gabriel Bauer.

LPC 13402: Río Futaleufú, Latitud 43° 10' 20.1" S, Longitud 71° 36' 23.8" O. Provincia del Chubut, Argentina. Septiembre 2011. Colector: Noelia Uyua y Gabriel Bauer.

LPC 13403: Río Futaleufú, Latitud 43° 10' 37.0" S, Longitud 71° 37' 41.1" O. Provincia del Chubut, Argentina. Abril 2011. Colector: Noelia Uyua y Gabriel Bauer.

LPC 13404: Río Azul, Latitud 42° 05' 12.4" S, Long. 71° 37' 10.4" O. Provincia del Chubut, Argentina. Noviembre 2012. Colector: Gabriel Bauer.

LPC 13405: Río Rivadavia, Latitud 42° 40' 27.2" S, Longitud 71° 41' 56.7" O. Provincia del Chubut, Argentina. Septiembre 2012. Colector: Gabriel Bauer.

LPC 13420: Río Grande, Estancia Menéndez, Latitud. 53° 50' S y Longitud 67° 47' O. Tierra del Fuego. Enero 2013. Colector: Ben Pascal.

LPC -13421: Río de las Vueltas, Latitud 49° 05' 46,1" S y Longitud 72° 53' 56,2" O. Provincia de Santa Cruz, Argentina. Marzo 2015. Colector: Subsecretaría de Pesca.

LPC -13422: Río de las Vueltas, Latitud 49° 06' 43,9" S, Longitud 72° 54' 44,3" O. Provincia de Santa Cruz, Argentina. Marzo 2015. Colector: Subsecretaría de Pesca.

La terminología usada para la descripción morfológica es la propuesta por Anonymous (1975), Ross *et al.* (1979) y Barber & Haworth (1981).

Para el análisis morfométrico se midieron 100 especímenes de cada una de las mues-

tras antes numeradas, considerando largo máximo y ancho máximo con el MO Leitz Wetzlar, de los cuales a 30 se les tomaron los datos adicionales de ancho del polo apical, ancho del polo basal, constricción del polo apical, constricción del polo basal, número de estrías en 10 μm , número de areolas en 10 μm y número de estigmas.

Para verificar las posibles diferencias significativas en el largo de *D. geminata* entre los diferentes ríos (poblaciones), se realizó el análisis de la varianza en una vía (ANOVA). Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa R paquete estadístico versión 2.15.1 (R development Core Team, 2013).

2.3. Resultados

2.3.1 *Didymosphenia geminata* en la Provincia del Chubut

El género *Didymosphenia* fue detectado por primera vez en Argentina en Agosto de 2010 frente a un lodge de pesca del Río Futaleufú cubriendo unos pocos metros cuadrados. Durante 2011 la especie se extendió formando colonias de varios metros cuadrados en esa misma cuenca. En febrero de 2012 la especie involucrada se registró por primera vez en el Río Rivadavia y en Agosto del mismo año ya se encontraba formando pequeños parches aislados en ese río. Estos ríos pertenecen a las subcuencas baja y media Austral y Oriental de la cuenca Futaleufú y están dentro del Parque Nacional Los Alerces. Después de varios meses, las colonias ampliaron la zona invadida, cubriendo unos 10 km del Río Rivadavia y nuevos ríos en la cuenca del Futaleufú. Al final del mismo año, la especie fue detectada en el Río Azul perteneciente a la cuenca Lago Puelo, al noroeste de la provincia lindando con la provincia de Río Negro. En este caso la especie formaba floraciones de 2-4 cm de espesor cubriendo todo tipo de sustratos. A pesar de que se ha ampliado la zona ocupada en el Río Azul, en la actualidad *Didymosphenia* comienza a formar blooms en primavera casi desapareciendo en invierno. (Figs. 7 y 8 A-C).

Al comienzo de la floración (primavera temprana), las colonias eran en forma de cojín, de color blanco-amarronado, semicirculares de pocos centímetro de diámetro, pero luego se convirtieron en grandes masas de diferentes longitudes (Fig. 7, 8 A-C, 9).

En el momento de los muestreos, en el Río Futaleufú, las floraciones persistieron durante todo el año cubriendo áreas de varios kilómetros cuadrados. En los ríos Azul y Rivadavia la zona ocupada fue menor que en el Río Futaleufú ya que estos últimos fueron colonizados recientemente. En el Río Azul, en octubre de 2013 la especie formaba una pequeña floración que cubría 1 m² aproximadamente. En los mismos sitios *Didymosphenia* formó grandes floraciones durante enero y febrero de 2014.

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut



7.A / RÍO FUTALEUFÚ, Provincia del Chubut
Colonia inicial de *Didymosphenia geminata*
sobre rocas.



7.B / RÍO FUTALEUFÚ, Provincia del Chubut
Colonia inicial de *Didymosphenia geminata*
sobre rocas.



7.C / RÍO FUTALEUFÚ, Provincia del Chubut
Colonia inicial de *Didymosphenia geminata*
sobre rocas.



7.D / RÍO FUTALEUFÚ, Provincia del Chubut
Colonia inicial de *Didymosphenia geminata*
sobre rocas.

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut



8.A / Colonias de *D. geminata*
RÍO FUTALEUFÚ,
Provincia del Chubut



8.B / Colonias de *D. geminata*
RÍO FUTALEUFÚ,
Provincia del Chubut



8.C / Colonias de *D. geminata*
RÍO FUTALEUFÚ,
Provincia del Chubut



8.D / Colonias de *D. geminata*
RÍO DE LAS VUELTAS
Provincia de Santa Cruz
*Ph: Subsecretaría de Pesca de
Santa Cruz*



8.E / Colonias de *D. geminata*
RÍO DE LAS VUELTAS
Provincia de Santa Cruz
*Ph: Subsecretaría de Pesca de
Santa Cruz*



8.F / Colonias de *D. geminata*
RÍO DE LAS VUELTAS
Provincia de Santa Cruz
*Ph: Subsecretaría de Pesca de
Santa Cruz*



8.G / Colonias de *D. geminata*
RÍO GRANDE
Provincia de Tierra del Fuego
*Ph: Secretaría de Desarrollo
Sustentable y Ambiente*



8.H / Colonias de *D. geminata*
RÍO GRANDE
Provincia de Tierra del Fuego
*Ph: Secretaría de Desarrollo
Sustentable y Ambiente*



8.I / Colonias de *D. geminata*
RÍO GRANDE
Provincia de Tierra del Fuego
*Ph: Secretaría de Desarrollo
Sustentable y Ambiente*

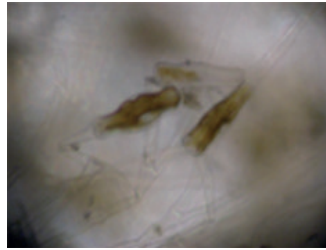
CAPÍTULO II

2.3. Resultados

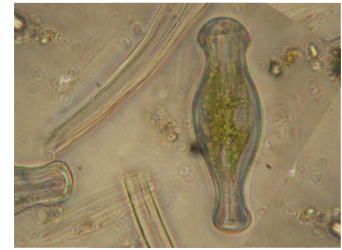
2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut



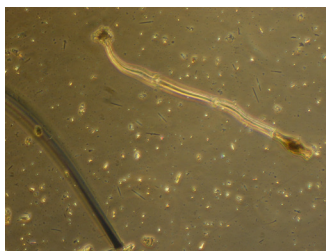
9.A / MO. Floración de
Didymosphenia geminata.
Aumento 200X



9.B / MO. Floración de
Didymosphenia geminata.
Aumento 200X



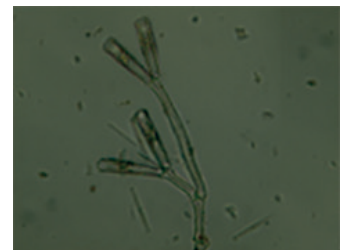
9.C / MO. Floración de
Didymosphenia geminata.
Aumento 400X



9.D / MO. Floración de
Didymosphenia geminata.
Aumento 100X



9.E / MO. Floración de
Didymosphenia geminata.
Aumento 200X



9.F / MO. Floración de
Didymosphenia geminata.
Aumento 200X

Descripción de los materiales analizados

Frústulos fuertemente silicificados, ligeramente cuneados con pocas cópulas. Valvas fuertemente heteropolares, ligeramente simétricas o asimétricas respecto el plano apical, con polos apicales y basales capitados (Figs. 10 y 11). La superficie valvar es plana y presenta en la unión con el manto costillas marginales que terminan en espinas en el polo apical (Fig. 12). Las estrías uniseriadas son radiales; alrededor del polo apical las estrías están dispuestas en forma de abanico (Fig. 12 A-E). El análisis con MEB muestra que las estrías apicales tienen un patrón ligeramente irregular cuando se contrasta con las estrías de la cara valvar. Las estrías se acortan alternadamente e irregularmente en la zona central. Areolas poroides ocluidas por volae con ranuras dendríticas entre el interior y el exterior (Figs. 12 G y 13 G). En el lado externo y alrededor de las areolas hay pequeñas papilas (Fig. 12 G). Internamente, la superficie valvar presenta costillas transapicales fuertemente ramificadas en el centro de la valva y los polos (Fig. 13 A-G). En sección transversal las costillas tiene un aspecto esponjoso y son de un espesor variable, constreñidas en

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut

el medio (Fig. 13 F-G). El polo basal tiene un gran campo de poros apical, con pequeños poroides alineados en filas longitudinales más o menos ordenados: 44 poroides en 10 μm (Fig. 12 I-J). El *rafe-sternum* es estrecho ensanchándose en una zona central elíptica con “areolas fantasmas”. El área central es apicalmente elíptica, ocupando 1/4 a 1/5 del ancho de la valva, con 2 a 5 estigmas. Las aberturas externas de los estigmas son ovaladas rodeadas por un borde delgado e internamente tienen forma globosa de aspecto esponjoso (Fig. 13 D-E). El rafe está ligeramente curvado con fisuras terminales largas y abruptamente dobladas hacia el lado opuesto de los estigmas (Fig. 11 A-E). Aunque ambas fisuras terminales son curvas, las fisuras terminales en el polo basal forman un ángulo casi recto, mientras que las del polo apical forman un ángulo obtuso (Fig. 11 A-E). Los extremos distales internos del rafe terminan ligeramente curvados hacia el mismo lado en una pequeña *helictoglossa* (Fig. 13 A-C). Las terminaciones externas proximales del rafe se expanden en una abertura en forma de lágrima (Fig. 12 A, F-G). Las terminaciones proximales internas están oscurecidas por un crecimiento nodular de sílice en el lado primario o secundario de la valva, en algunos casos con una pequeña hendidura en dirección apical (Fig. 13 D-E). La cintura está compuesta por pocas (4) bandas abiertas en el polo basal con una fila discontinua de poroides (Fig. 12 H).

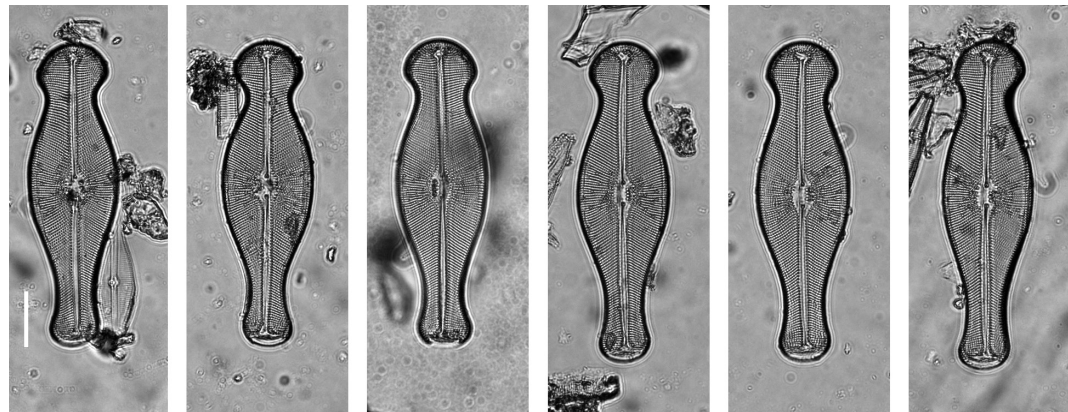
La comparación de la morfología de la valva de varios ejemplares de la misma población mostró algunas variaciones, por ejemplo, algunos especímenes recolectados en el Río Azul poseen espinas bilobuladas o trilobuladas (Fig. 12 D) mientras que en otros las espinas están poco desarrolladas (Fig.: 12 B-C) y la costilla marginal es casi continua en el polo apical (Fig. 12 D). Por otra parte, la comparación de los materiales de los 3 ríos estudiados muestran que las valvas de algunos especímenes son ligeramente asimétricas respecto al plano apical (principalmente los del Río Azul) mientras que otras son casi simétricas como los especímenes de los ríos Futaleufú y Rivadavia (Fig. 11 A-J). Además, las fisuras terminales del rafe varían siendo más o menos curvadas y a veces irregulares en vez de rectas.

El análisis de parámetros morfométricos muestra que en el Río Futaleufú las células de mayor tamaño se encuentran en otoño y las de menor tamaño a principios de verano (Tabla 1). Esto podría estar mostrando parte del ciclo de vida de *Didymosphenia*, durante el cual en otoño ocurriría la reproducción sexual (aunque nunca se observaron células iniciales a lo largo de este estudio), y por eso se observan las células más grandes, alcanzando en verano el tamaño viable más pequeño. Esto es solo una conjetura, ya que para poder corroborarla se debería llevar a cabo otro tipo de muestreo y estudio. También se observaron diferencias morfométricas entre las poblaciones de los tres ríos, siendo las del Río Futaleufú las más grandes y las del Río Rivadavia las más pequeñas (Tabla 2).

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut



10.A

10.B

10.C

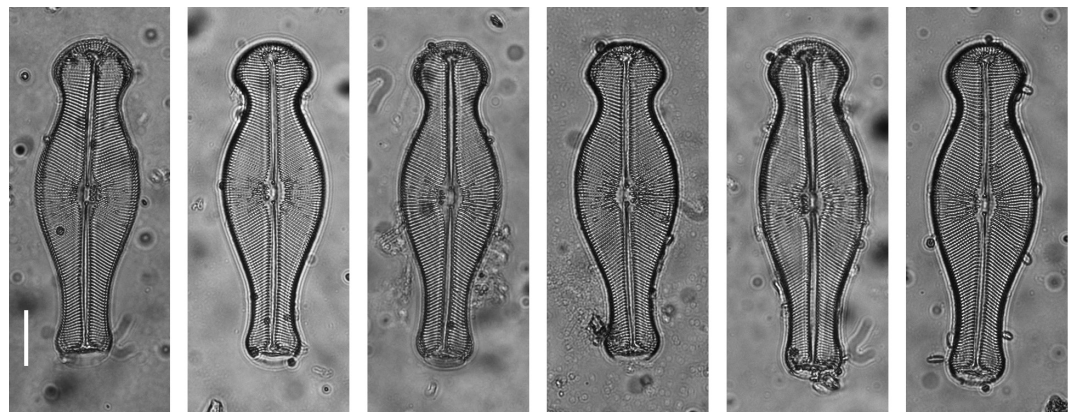
10.D

10.E

10.F

Fig. 10 / MO. *Didymosphenia* del Río Futaleufú, provincia del Chubut.

Escala = 20 μ m



10.G

10.H

10.I

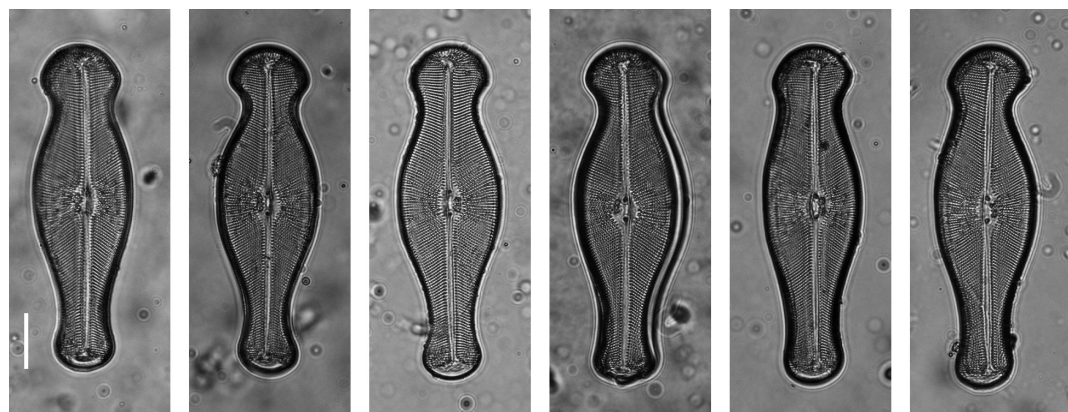
10.J

10.K

10.L

Fig. 10 / MO. *Didymosphenia* del Río Rivadavia, provincia del Chubut.

Escala = 20 μ m



10.M

10.N

10.Ñ

10.O

10.P

10.Q

Fig. 10 / MO. *Didymosphenia* del Río Azul, provincia del Chubut.

Escala = 20 μ m

Tabla 1. Datos morfométricos de *Didymosphenia* colectados en diferentes épocas en el Río Futaleufú. DE: Desviación estándar.

VARIABLE		Septiembre 2010	Abril 2011	Septiembre 2011
Largo (µm)	Media ±DE	125.54±1.92	137.5±4.11	131.21±2.54
	Rango	122-130	130-146.9	126.1-139
Ancho (µm)	Media ±DE	36.6±0.91	38.88±1.82	38.5±1.34
	Rango	35-38.8	32.5-41.6	35.1-41.6
Ancho polo apical (µm)	Media ±DE	27.5±1.67	30.13±2.08	30.25±1.63
	Rango	24.4-32.5	21.2-33.8	28.6-35.1
Ancho de la constricción del polo apical (µm)	Media ±DE	20.34±1.37	20.8±2.21	22.1±1.99
	Rango	17.5-25	18.2-27	18.2-27.3
Ancho polo basal (µm)	Media ±DE	20.5±1.28	21.6±1.3	22.1±1.23
	Rango	17.5-23.8	18.2-24.7	18.2-23.4
Ancho de la constricción del polo basal (µm)	Media ±DE	16.62±1.29	16.78±1.69	17±1.18
	Rango	14.03-20	14.3-20.8	14.3-19.5
Estrias/ 10 µm (centro)	Rango	9-10	9-10	9-10
Estrias/ 10 µm (polo apical)	Rango	9-11	9-11	9-11
Estrias/ 10 µm (polo basal)	Rango	9-11	8-11	10-11
Estigma	Rango	2-4	2-5	2-5

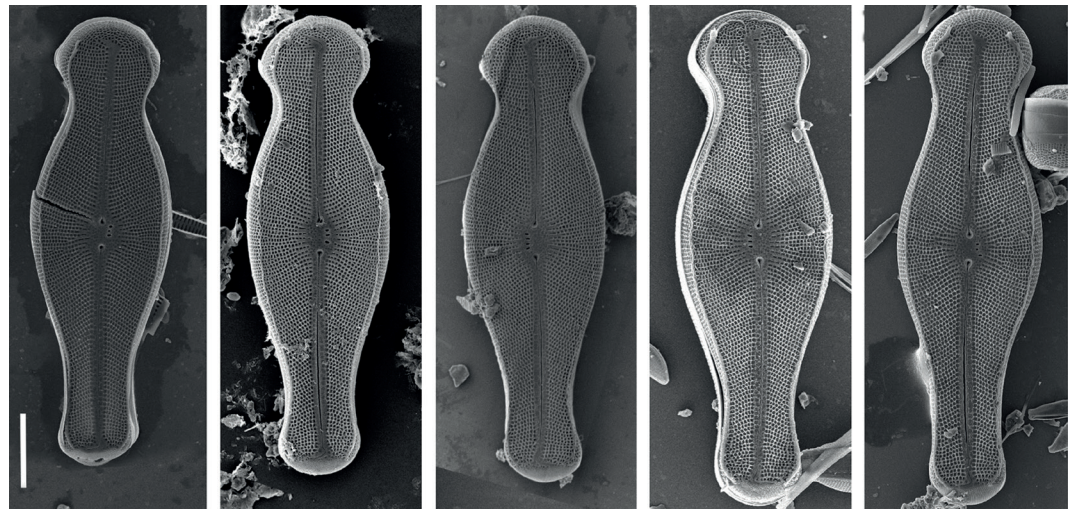
Tabla 2. Datos morfométricos de especímenes de *Didymosphenia* colectados en tres ríos de la provincia del Chubut. DE: Desviación estándar.

VARIABLE		Río Futaleufú	Río Rivadavia	Río Azul
Largo (µm)	Media ±DE	131.42±5.73	116.16±3.98	127.86±3.54
	Rango	122-146.9	109.8-123.22	118.3-134.2
Ancho (µm)	Media ±DE	38±1.72	33.9±1.53	37.2±1.62
	Rango	32.5-41.6	30.5-36.6	32.9-39.7
Ancho polo apical (µm)	Media ±DE	29.29±2.19	24.156±1.57	28.2±1.93
	Rango	21.2-35.1	20.74-26.84	24.4-31.7
Ancho de la constricción del polo apical (µm)	Media ±DE	21.08±2.01	16.91±1.54	20.18±1.73
	Rango	17.5-27.3	14.64-19.52	17.08-23.18
Ancho polo basal (µm)	Media ±DE	21.4±1.43	17.4±1.04	21.2±1.64
	Rango	17.5-24.7	15.9-19.5	18.3-24.4
Ancho constricción polo basal (µm)	Media ±DE	16.79±1.4	13.28±1	17.45±1.5
	Rango	14.03-20.8	11.59-15.86	14.64-20.13
Estrias/ 10 µm (centro)	Rango	9-11	9-11	9-11
Estrias/ 10 µm (polo apical)	Rango	9-11	9-11	9-11
Estrias/ 10 µm (polo basal)	Rango	8-11	9-11	9-10
Estigma	Rango	2-5	2-5	2-5

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut



11.A

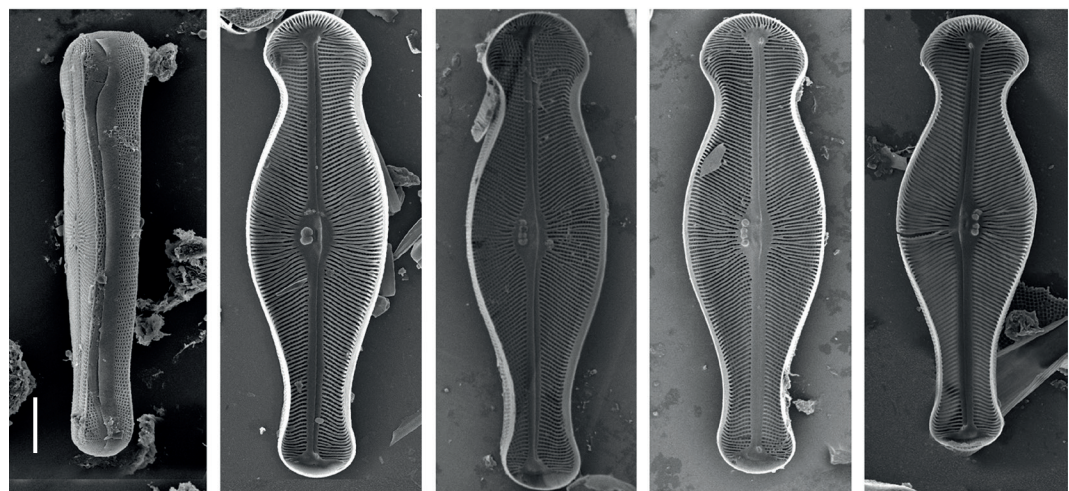
11.B

11.C

11.D

11.E

Fig. 11 / MEB. *Didymosphenia* de la provincia del Chubut. Frústulos en vista externa. **A:** vista general de la valva, Río Rivadavia. **B-C:** vista general de la valva, Río Futaleufú. **D-E:** vista general de la valva, Río Azul. Escala = 20 μ m (Figs A-E).



11.F

11.G

11.H

11.I

11.J

Fig. 11 / MEB. *Didymosphenia* de la provincia del Chubut. **F:** frústulo en vista conectival, Río Futaleufú. **G-J:** valva en vista interna: **G:** Río Azul. **H-I:** Río Futaleufú. **J:** Río Rivadavia. Escala = 20 μ m (Figs F-J).

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut

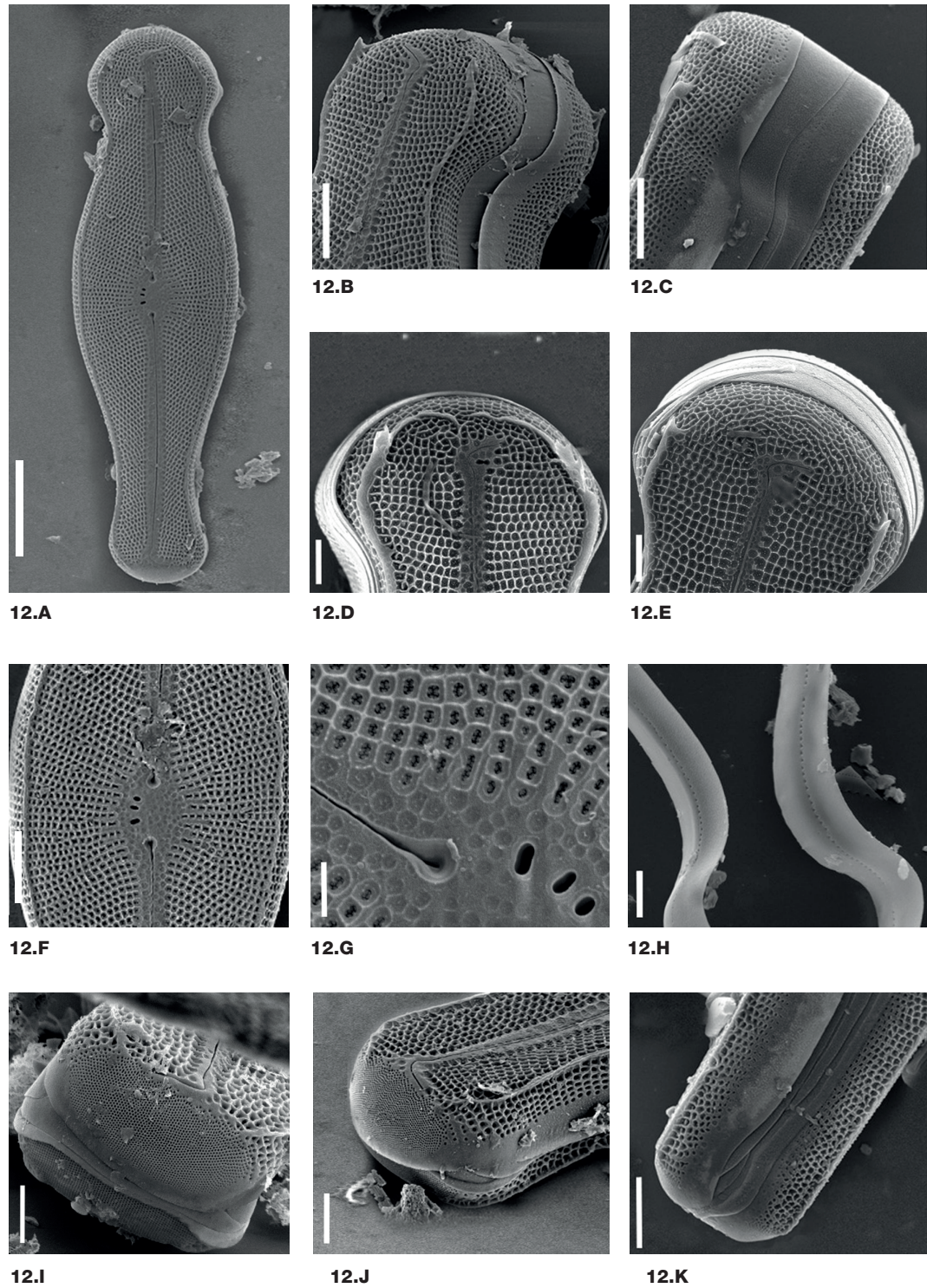


Fig. 12 / MEB. Frústulos de *Didymosphenia*. **A:** frústulo en vista valvar. **B:** detalle del polo apical, Río Futaleufú. **C:** detalle del polo apical, Río Azul. **D-E:** detalle del polo apical en vista conectival, Río Azul. **F:** detalle del centro de la valva. **G:** detalle de la zona central. **H:** banda con una fila de poroides. **I-J:** detalle del campo apical de poros. **K:** detalle del polo basal en vista conectival.

Escalas A = 20 μm ; B-C, F, K = 10 μm ; D-E, H-J = 5 μm ; G = 2 μm .

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.1 *D. geminata* en Pcia. del Chubut

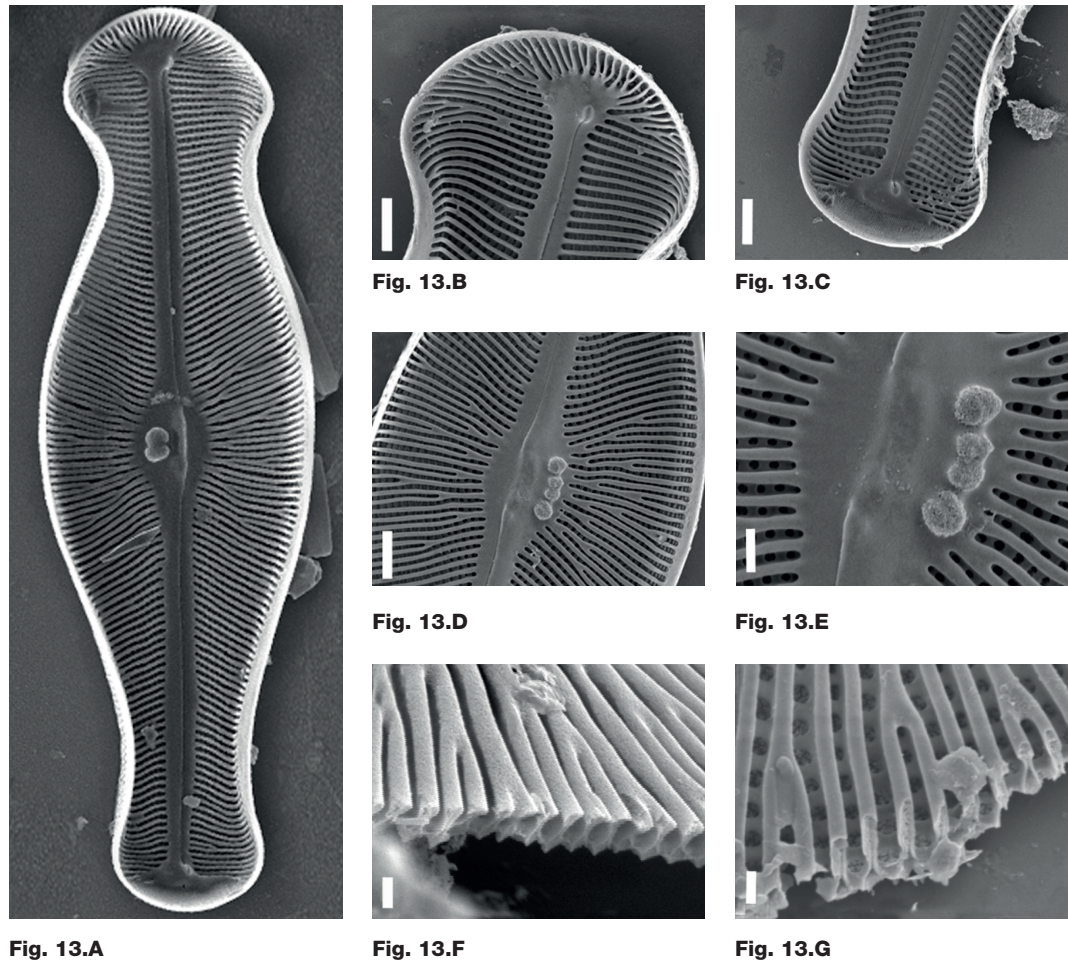


Fig. 13 / MEB. *Didymosphenia*. Frústulo en vista interna. **A:** vista general del frústulo. **B:** detalle del polo apical. **C:** detalle del polo basal. **D:** centro del frústulo. **E:** detalle de la zona central. **F:** corte transversal del frústulo. **G:** Detalle de la estructura de la frústulo.

Escalas A = 20 μm ; B-D = 5 μm ; E = 2 μm ; F-G = 1 μm .

2.3.2 *Didymosphenia geminata* en la Provincia de Tierra del Fuego

El análisis con microscopio óptico del material sin tratar dio resultados positivos confirmando la presencia de *Didymosphenia* en la Isla Grande de Tierra del Fuego. De acuerdo a los documentos fotográficos que acompañaron la muestra, las colonias formaban densas capas de mucílago color marrón en algunos sectores (Figs. 8 G-I) como los observados en los ríos de la Provincia del Chubut.

Descripción del material estudiado

Valvas fuertemente heteropolares, simétricas respecto del eje apical, con los polos fuertemente capitados (Fig. 14 y 15). Superficie valvar plana con costillas marginales en la unión de la superficie valvar y el manto, terminadas en espinas en el polo apical. Algunos ejemplares

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.2 *D. geminata* en Pcia. de Tierra del Fuego

muestran una espina simple mientras que otros presentan una espina de extremos aserrados (Figs. 16 A-C). Estrías uniseriadas fuertemente radiales a lo largo de la valva; cerca del polo anterior las estrías son paralelas (Fig. 16). Internamente, la superficie valvar presenta costillas transapicales ramificadas en el centro de la valva y los extremos (Fig. 16). Areolas ocluidas por volae (Fig. 16), externamente las areolas están rodeadas de pequeñas papilas. El polo basal presenta un campo de poros amplio, con pequeños poroides alineados en hileras longitudinales. El esternón, que presenta areolas no perforadas, es angosto y se ensancha en el área central elíptica, con 2-5 estigmas con abertura externa ovalada y oclusión interna globosa y esponjosa (Fig. 17). Rafe lateral, ligeramente curvado; fisuras terminales largas torcidas abruptamente hacia el lado opuesto de los estigmas. La forma de la fisura terminal del polo apical es diferente a la del polo basal (Fig. 16). Los extremos proximales externos del rafe están expandidos en forma de lágrima (Fig. 16) y los internos están situados debajo del nódulo central que presenta una depresión media. Extremos distales internos torcidos en la misma dirección, terminando en pequeñas *helictoglossae* (Fig. 16). Bandas de la cintura, abiertas en el polo basal, con una hilera discontinua de poroides.

Dimensiones: largo: 89-132 μm ; ancho 26-40.5 μm ; l/a: 3.1-3.6; estrías: 8-15 en 10 μm ; areolas: 11-16 en 10 μm ; estigmas: 2-5; 40-44 hileras de areolas en los campos de poros en 10 μm y 14 areolas en 10 μm en la cintura.

Desde el punto de vista morfológico y morfométrico, los especímenes de Tierra del Fuego presentan variaciones intrapoblacional en lo que respecta a las fisuras terminales del rafe del polo anterior y a la morfología de las espinas con tres puntas en algunos ejemplares y en otros muy poco desarrolladas.

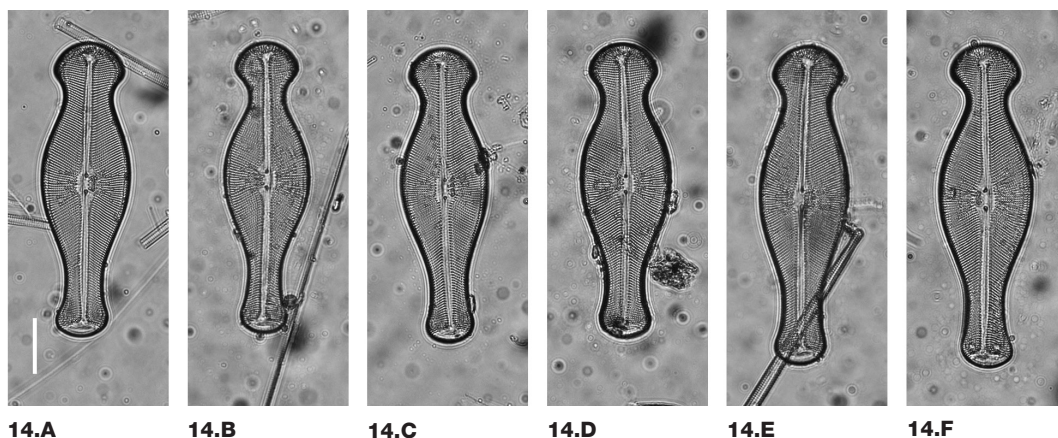


Fig. 14 / MO. *Didymophenia* del Río Grande, Provincia de Tierra del Fuego.

Escala = 20 μm

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.2 *D. geminata* en Pcia. de Tierra del Fuego

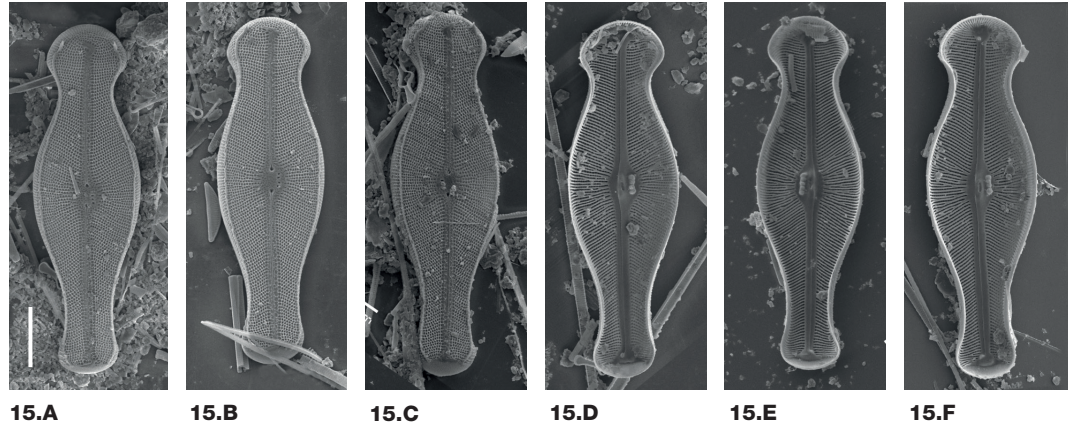


Fig. 15 / MEB. *Didymosphenia* del Río Grande, Provincia de Tierra del Fuego.

A-C: Valvas en vista externa. **D-F:** Valvas en vista interna.

Escala= 20 μ m

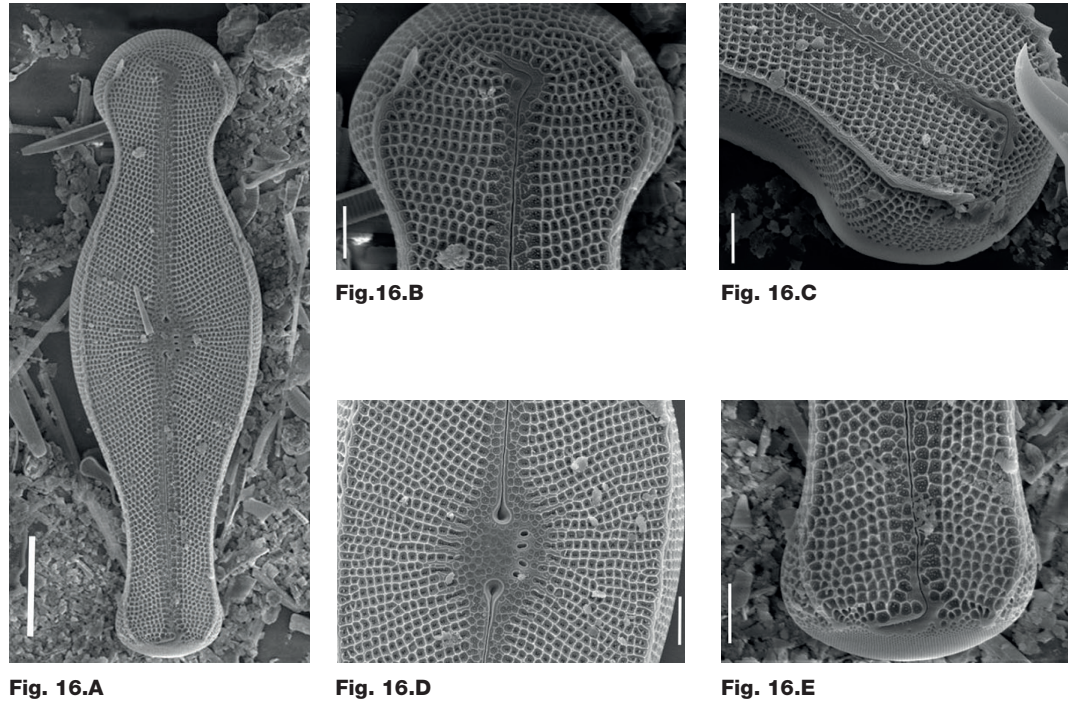


Fig. 16. MEB. Frústulos de *Didymosphenia*, Río Grande, en vista externa. **A:** vista general. **B-C:** detalles del polo apical en diferentes posiciones. **D:** detalle del centro del frústulo. **E:** detalle del polo basal.

Escalas: A=20 μ m, B-E = 5 μ m.

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.2 *D. geminata* en Pcia. de Tierra del Fuego

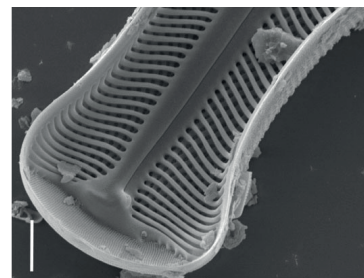
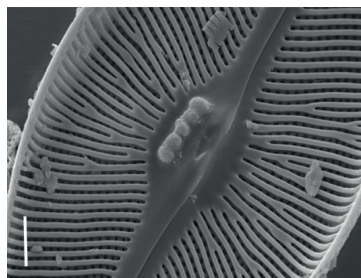
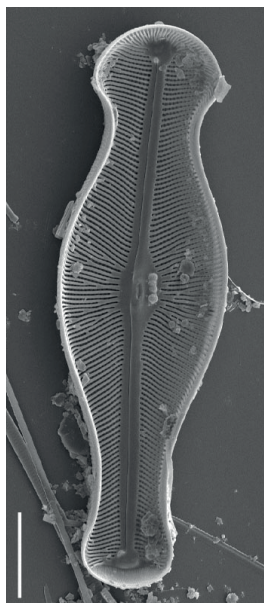


Fig. 17.A / MEB. Frústulo en vista interna de *Didymosphenia* del Río Grande, provincia de Tierra del Fuego. Vista general del frústulo. Escala: 20 µm

Fig. 17.B / MEB. Frústulo en vista interna de *Didymosphenia* del Río Grande, provincia de Tierra del Fuego. Detalle del área central. Escala: 5 µm

Fig. 17.C / MEB. Frústulo en vista interna de *Didymosphenia* del Río Grande, provincia de Tierra del Fuego. Detalle del polo basal. Escala: 5 µm

2.3.3 *Didymosphenia geminata* en la Provincia de Santa Cruz

El análisis con microscopio óptico del material sin tratar dio resultados positivos confirmando la presencia de *Didymosphenia* en el Río de las Vueltas en la Provincia de Santa Cruz (Fig. 18)

Descripción del material estudiado

En dos de los sitios de muestreo del Río de las Vueltas el análisis con MO mostró la presencia de dos morfotipos:

Morfotipo 1: los especímenes presentan similares características a las de los hallados en Tierra del Fuego y Chubut. Frústulos con forma de cuña en vista conectival. Manto valvar bien desarrollado. Polo apical y basal capitados, siendo el extremo apical de mayor tamaño que el extremo basal. Área central hialina ovoide, asimétrica (Fig. 19 I-M) con 2 a 4 estigmas. Aberturas externas de los estigmas redondeados y en algunos casos alargados (Fig. 20 A-D). Rafe central lateral, fisuras distales y proximales curvadas hacia el lado opuesto de los estigmas. Estrías radiales en la zona central de la valva, alternando largas y cortas, volviéndose divergentes hacia los polos y radiales en el extremo apical. Las estrías se extienden sobre la superficie valvar alcanzando la mitad del manto, dejando una zona hialina en el borde de la valva (Fig. 20 A-D).

Dimensiones: largo: 126.8-133.6 µm; ancho: 36.6-39.6 µm; l/a: 3.3-3.5; estrías: 10-11 en 10 µm; areolas: 10-12 en 10 µm; estigmas: 2-4.

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.3 *D. geminata* en Pcia. de Santa Cruz

Morfotipo 2: este morfotipo se diferencia del morfotipo 1 en el tamaño marcadamente menor y en el contorno valvar. Presenta polos subcapitados y constricciones de los polos poco marcadas. Asimismo, el área central es amplia (en relación al tamaño de la célula) y posee 1 a 3 estigmas (Figs. 19 A-H; 20 E-H). Sin embargo, los detalles de la morfología fina coinciden con los de la de los ejemplares del morfotipo 1.

Dimensiones: largo: 54.9-74.4 μm ; ancho: 26.2-32.3 μm ; l/a: 1.92-2.67; estrías: 9-11 en 10 μm ; areolas: 11-12 en 10 μm ; estigmas: 1-3.

El análisis con MEB mostró que ambos morfotipos presentan un reborde silíceo en la unión de la superficie valvar y manto terminando en una espina poco o muy desarrollada en el polo apical. Areolas subcuadrangulares (presentándose algunas con cinco o seis lados) con rebordes altos y papilas rodeando la areola en forma de pequeñas espinas del lado interno de la abertura (Figs. 20 C y G). Las areolas del manto van disminuyendo su tamaño a medida que se alejan de la cara valvar hasta desaparecer dejando una zona hialina en el borde inferior del manto. En el área central y alrededor del rafe se encuentran “areolas fantasmas” no perforadas de forma más redondeada y de diferentes tamaños, presentando las de mayor tamaño pequeñas papilas (Figs. 20 C y G). Internamente cada aréola se abre en una ranura dendroide (Fig. 21 E). Cintura con cuatro bandas abiertas, anchas, provistas de una hilera discontinua de poros (Fig. 21 C).

En las muestras recolectadas en Marzo de 2015, en el sitio donde se encontraron ambos morfotipos, las células pequeñas estaban en una proporción del 94 %. En el resto de los sitios muestreados (5) solo se hallaron ejemplares del morfotipo 2. En la muestra recolectada en Diciembre de 2015, la proporción de células del morfotipo 2 fue menor que la proporción de células del morfotipo 1.

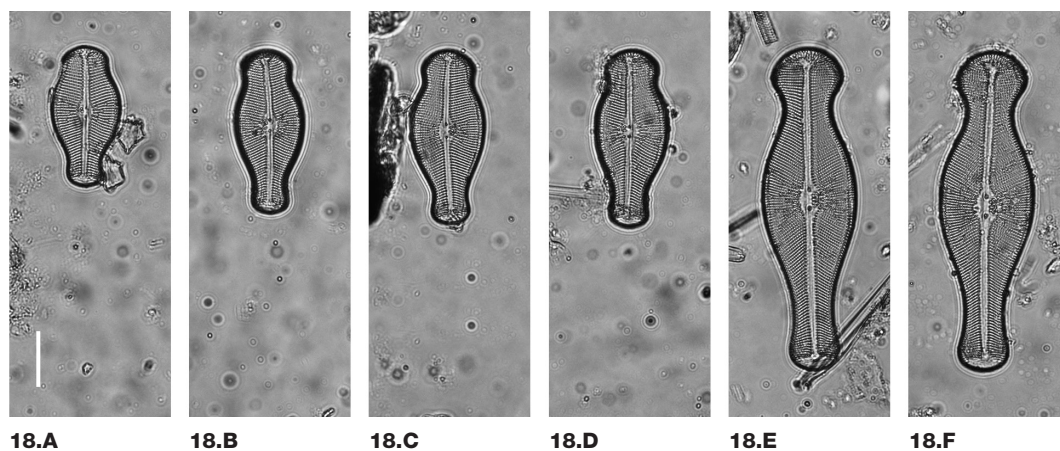


Fig. 18 / MO. *Didymosphenia* del Río de las Vueltas, Provincia de Santa Cruz.

Escala= 20 μm

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.3 *D. geminata* en Pcia. de Santa Cruz

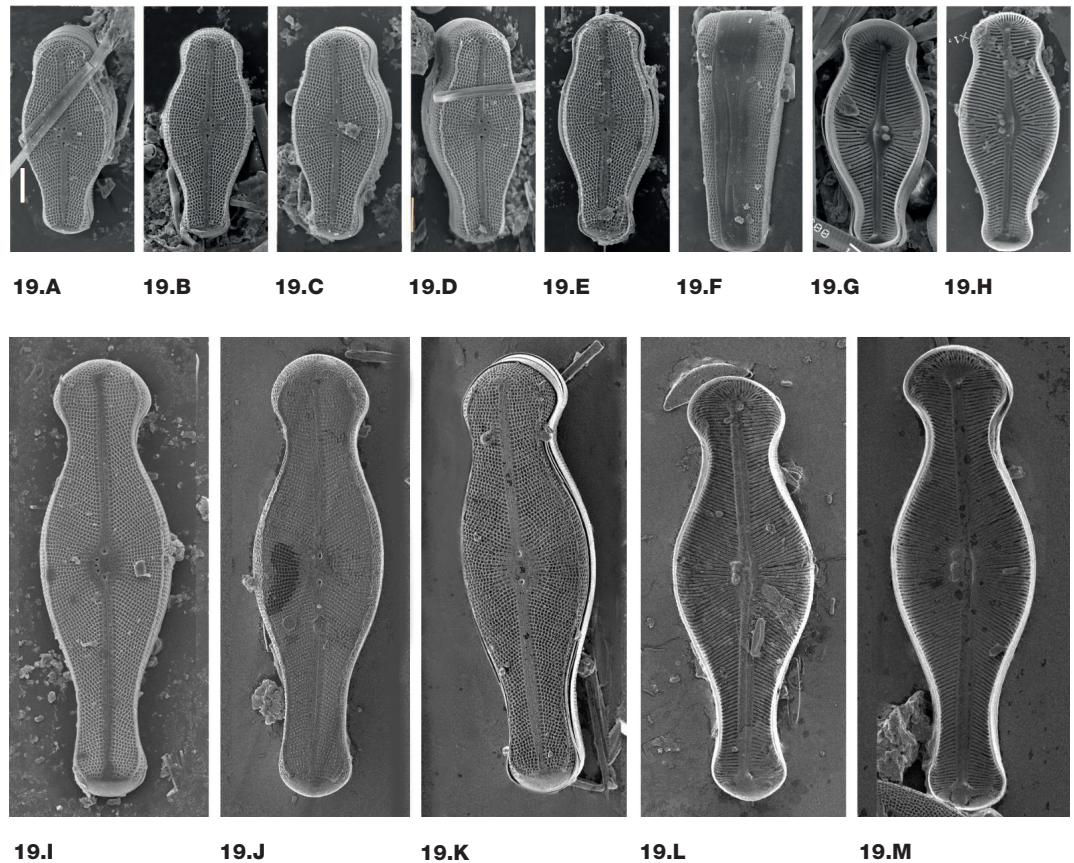


Fig. 19 / MEB. *Didymosphenia* del Río de las Vueltas, provincia de Santa Cruz.

A-H: Morfotipo 2. A-E: vista del frústulo externa. **F:** frústulo en vista conectival. **G-H:** vista valvar interna.

I-M: Morfotipo 1. I-K: vista valvar externa. **L-M:** vista valvar interna. Escala = 10 μm

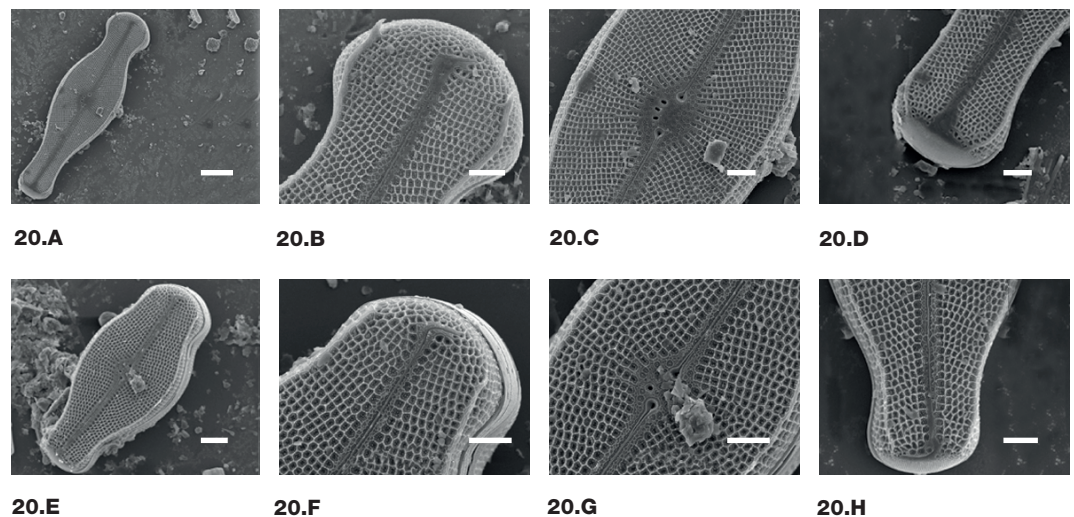


Fig. 20 / MEB. Comparación de la morfología valvar externa de los dos morfotipos hallados en el Río de las Vueltas, provincia de Santa Cruz.

A-D: Morfotipo 1. A: vista valvar externa. **B:** detalle del polo apical. **C:** detalle del área central. **D:** detalle del polo basal. **E-H: Morfotipo 2. E:** vista valvar externa. **F:** detalle del polo apical. **G:** detalle del área central. **H:** detalle del polo basal. Escalas: A= 20 μm , E= 10 μm , B-D y F-H= 5 μm .

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.3 *D. geminata* en Pcia. de Santa Cruz

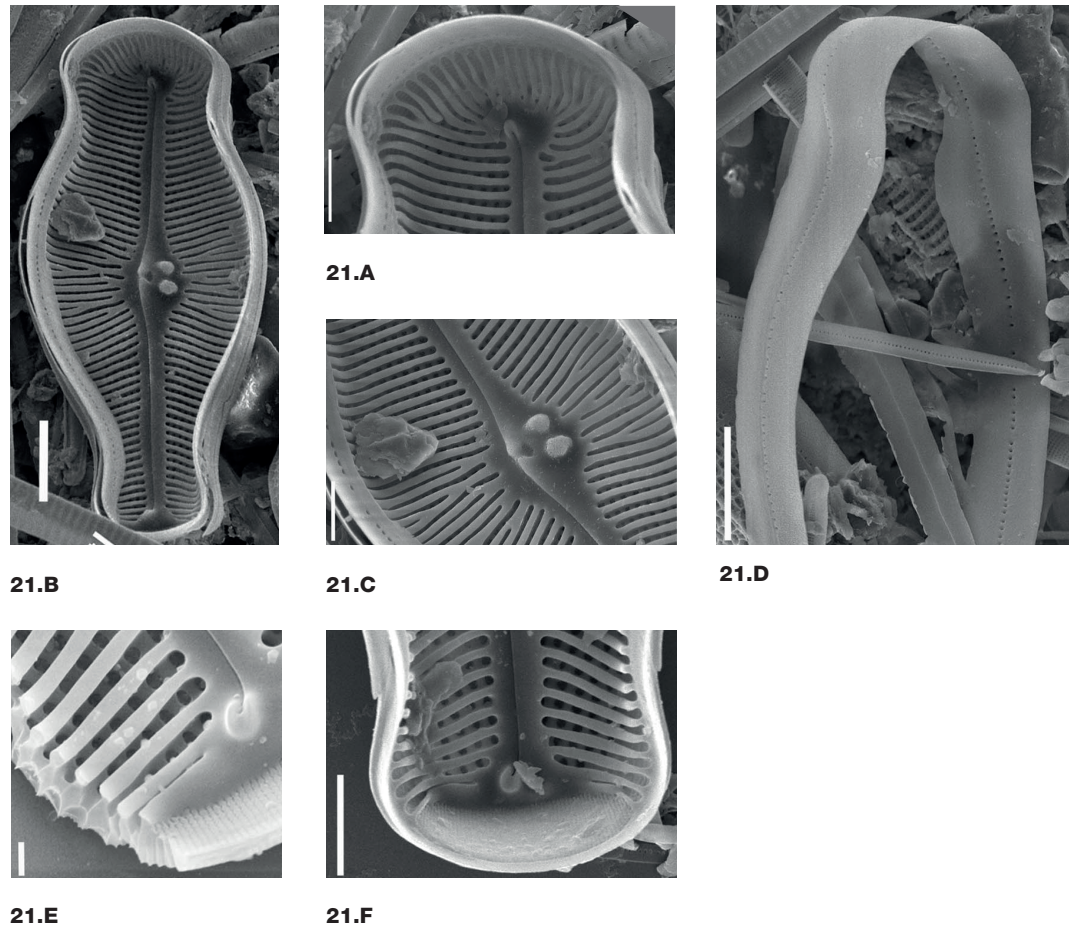


Fig. 21 / MEB. Frústulo en vista interna del *Morfotipo 2* del Río de las Vueltas, provincia de Santa Cruz. **A:** vista general del frústulo. **B:** detalle del polo apical. **C:** detalle del área central. **D:** detalle de una cópula. **E:** detalle de la estructura del frústulo. **F:** detalle del polo basal. Escalas A,D= 10 μm , B, C y F = 5 μm , E= 2 μm .

2.4 Discusión

Didymosphenia geminata presenta una gran variación en algunas de sus características morfológicas y morfométricas y, a veces estos caracteres parecen ser insuficientes para establecer con certeza los límites específicos (Metzeltin & Lange-Bertalot, 2014). Los especímenes de la provincia del Chubut tienen algunas características morfológicas que difieren del lectotipo de *D. geminata* y otras que comparte con otras especies del género.

Los especímenes estudiados muestran variaciones dentro y entre poblaciones en algunas estructuras, como espinas, fisuras terminales del rafe y nódulo central. Por ejemplo, los especímenes de Tierra del Fuego presentaron una marcada y corta depresión en el nódulo central. Las diferencias morfológicas entre poblaciones podrían deberse a diferencias ambientales: una mayor concentración de sílice en el agua permitiría dar lugar a estructuras más silicificadas como espinas bi o trilobuladas o la continuación del borde síliceo entre la cara

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.4 D. Discusión

valvar y el manto sobre el polo apical, pero no contamos con datos disponibles para probarlo. En general, los materiales de Patagonia sur presentan en vista externa las mismas características morfológicas y morfométricas y variaciones descritas para especímenes hallados en la provincia de Río Negro (Beamud *et al.*, 2013).

En comparación con las muestras descritas en otras regiones del mundo, los especímenes de Chubut y Tierra del Fuego tienen un estrecho rango de variación de tamaño que representa sólo un parte del ciclo celular descrito para la especie, con exclusión de las formas más pequeñas. Sin embargo, coinciden en tamaño con el material tipo de las especies de las Islas Feroe (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de datos morfométricos de materiales estudiados y taxas cercanas al género.

VARIABLE	Autor	Largo µm	Ancho µm	Estrias/ 10µm	Estigma	Areolas/ 10 µm	Areolas del campo apical de poros/ 10 µm
<i>D. geminata</i> de Chubut (Argentina)	Este estudio	109-147	30-42	8-11	2-5	10-12	42-44
<i>D. geminata</i> de Santa Cruz (Argentina). Morfotipo 1	Este estudio	126-134	36-39	10-12	2-4		
<i>D. geminata</i> de Santa Cruz (Argentina). Morfotipo 2	Este estudio	54-75	26-33	9-11	1-3		
<i>D. geminata</i> de Tierra del Fuego (Argentina)	Este estudio	125-146	37-42.5	8-11	2-5		
<i>Echinella geminata</i> Lyngbye (material tipo)	Metzeltin & Lange-Bertalot	105-120	35-40	7.5-10	3-7	10-12	-
<i>Echinella geminata</i> Lyngbye (material de Islas FaroeVidhøy, colectadas en 1983)	2014	78-102	29-37	8-9	2-4	-	-
<i>D. geminata</i> de Chile	Rivera et al. 2013	108-138	33-43	9-10	2-5	10-11	40-50
<i>D. geminata</i> de EEUU	Spaulding 2010	65-161	36-41	7-9	2-5	-	-
<i>D. geminata</i> de Nueva Zelanda	Kilroy et al. 2004	>100	>35	-	-	-	-
<i>D. geminata</i> ssp. <i>geminata</i>	Metzeltin & Lange-Bertalot,	48-132	25-45	8-10	1-7	9-12	-
<i>D. geminata</i> ssp. <i>crassa</i>	2014	110-140	45-50	8-10	2-5?	7-8	-
<i>D. clavaherculis</i> (Ehr.) Metzeltin & Lange Bertalot		130-135	33-38	8-9	3	10-12	-
<i>D. clavamagna</i>		83-215	34-57	7-9	2-7	10-12	-
<i>D. coronata</i>		50-110	27-42	9-10	0-3	9-10	-
<i>D. laticollis</i>		57-123	32-42	7-9	2-5	8-12	-
<i>D. hulli</i>	Khan-Bureau et al. 2016	40-60	26.5-30.5	9-11	1-4		

Los especímenes designados como *D. geminata* morfotipo *geminata* de diferentes regiones del mundo son diferentes unos de otros en cuanto al contorno valvar (Whitton *et al.*, 2009; Stoermer *et al.*, 1986). Nuestros ejemplares son menos variables en relación a las constricciones de los polos apical y basal, pero tienen un amplio rango de densidad de estrías y relación ancho máximo/ancho polo apical. Stoermer y colaboradores (1986) señalan que la característica más importante que distingue la población del Lago Baikal de las que ocurren en otros hábitats es la asimetría del frústulo (característica considerada como diagnóstica para el taxón). En relación con este carácter, en Chubut encontramos especímenes con y sin simetría cymbeloide, lo que demuestra que este no es un carácter diagnóstico de la especie.

Metzeltin y Lange-Bertalot (2014) no consideraron los morfotipos *geminata* sensu stricto, *capitata* y *subcapitata* propuestos por ellos en 1995 y describieron dos subespecies: *Didymosphenia geminata* ssp. *geminata* y *Didymosphenia geminata* ssp. *crassa*. La primera sería un taxón cosmopolita mientras que la segunda tiene una distribución restringida (Siberia y Países Bajos). Las diferencias entre estas dos subespecies están relacionadas con el contorno valvar y la densidad de areolas. Los materiales de la Patagonia argentina coinciden en datos morfométricos con *Didymosphenia geminata* ssp. *geminata*, aunque los especímenes más grandes exceden la longitud máxima de 132 µm dada por Metzeltin & Lange-Bertalot (2014) y no se encontraron especímenes menores a 109 µm (Tabla 3), exceptuando en la provincia de Santa Cruz.

En 1995 Metzeltin y Lange-Bertalot describieron *D. siberica* (Grunow) M. Schmidt, *D. curvata* (Skvortzow & Meyer) Metzeltin & Lange-Bertalot, *D. clavaherculis* (Ehrensberg) Metzeltin & Lange-Bertalot y *D. pumila* Metzeltin & Lange-Bertalot. En 2014 los mismos autores redefinieron *D. siberica* y *D. clavaherculis* excluyendo materiales que se describieron bajo ese nombre en 1995. Además, en esta nueva revisión erigieron 10 nuevas especies: *D. clavamagna*, *D. coronata*, *D. crassiporata*, *D. grunowii*, *D. laticeps*, *D. laticollis*, *D. mongolica*, *D. nipponica*, *D. skvortzowii*, *D. strelnikovae* y describieron en detalle *D. curvata* (Skvortzow & Meyer) Metzeltin & Lange Bertalot, *D. curvirostrum* Tempere & Brun, *D. dentata* (Dorogostaisky) Skortzow, *D. dorogostaiskyi* (Skovort & Meyer) Metzeltin, Lange-Bertalot & Kulikovsskiy, *D. fossilis* Horikawa y Okuno, *D. lineata* Skabichevsky, *D. pumila*, *D. tatrensis* Mrozinska *et al.* y *D. subcapitata* (Skvorzow & Meyer) Metzeltin & Lange-Bertalot. La comparación de los materiales de Argentina con los taxones descritos por Metzeltin y Lange-Bertalot (2014) muestra que son diferentes a los de *D. siberica*, *D. mongolica* y *D. pumila* ya que presentan un contorno valvar menos construido, ápices poco diferenciados y estructura de las areolas distinta. Nuestros especímenes difieren de *D. tatrensis* y *D. grunowii* en la ausencia del reborde marginal; de *D. curvata* en su fuerte asimetría respecto al eje apical y de *D. fossilis* y *D. nipponica* se distinguen fácilmente por el contorno valvar, la simetría y la estructura de las areolas. *D. dentata* y *D. subcapitata* son

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.4 D. Discusión

similares en líneas generales con respecto al contorno valvar, pero presentan fuertes espinas alrededor de margen de la valva y *D. dorogostaiskyi* difiere no sólo en la presencia de espinas sino también en su contorno valvar. Los especímenes estudiados se asemejan a un grupo de especies: *D. clavaherculis*, *D. clavamagna*, *D. coronata* y *D. laticollis*. *D. coronata* tiene polos subcapitados, rango de longitud más pequeño y estigmas circulares con aberturas externas más pequeñas que los de los especímenes del Chubut. Además, se trata de una especie rara, exclusiva de Asia. Nuestros ejemplares son similares en el contorno valvar a algunos ejemplares de *D. laticollis* pero esta especie tiene la constricción del polo apical menos marcada. Sin embargo, la validez de este taxón es cuestionable, ya que los propios autores señalan que sólo las investigaciones moleculares pueden dar resultados más precisos acerca de su identidad. Los materiales de Chubut son morfológicamente similares a *D. clavaherculis* (Ehrenberg) sensu Metzeltin & Lange- Bertalot 1995, pero, según Metzeltin & Lange-Bertalot, (2014: lámina 57), el material tipo de *D. geminata* ssp *geminata* difiere de *D. clavaherculis* por presentar valvas en forma de cuña y extremos subcapitados al igual que los materiales de Argentina. Aunque los autores señalan que *D. clavaherculis* es una “especie débilmente fundamentada” siguen considerando como otro morfotipo a *D. clavaherculis* s. str. que puede confundirse fácilmente con *D. geminata*. Por otro lado, estos autores mencionan que los especímenes considerados *D. clavaherculis* en Metzeltin & Lange-Bertalot (1995) (figuras 4: 5-8, 7: 6 y 8: 4) pertenecen a *D. clavamagna*. A pesar de que los especímenes más grandes de *D. clavamagna* difieren claramente de *D. geminata*, los especímenes más pequeños pueden confundirse con facilidad, pero se pueden distinguir por presentar una zona central estrecha y estrías fuertemente convergentes en ambos polos a diferencia de *D. geminata* que presenta estrías subparalelas/paralelas en el polo basal. Además, *D. clavamagna* tiene varias espinas en el extremo de la costilla marginal y las fisuras terminales del rafe forman un ángulo recto.

En relación a las características morfométricas, nuestros materiales están comprendidos dentro del rango de longitud de *D. geminata* ssp *geminata* aunque, como hemos mencionado anteriormente, en Chubut no encontramos especímenes menores a 109 µm de longitud a pesar de haber analizado muestras de diferentes épocas del año para abarcar distintos estadios del ciclo de vida de *Didymosphenia*. Teniendo en cuenta la relación ancho máximo/ ancho polo apical, las muestras de Chubut tienen un rango más amplio de variación que todas las especies mencionadas.

Los especímenes colectados en el Río de las Vueltas de la provincia de Santa Cruz mostraron algunas diferencias morfológicas en comparación con los especímenes hallados hasta el momento en los otros sitios de la Patagonia. Las células entre los 54 y 74 µm de largo tienen polos subcapitados, constricciones de los polos menos marcadas y 1 a 3 estigmas. Estos especímenes pequeños pueden ser confundidos bajo el microscopio

óptico con *D. tatrensis* (Mrozińska, Czerwik-Marcinkowska & Gradziński), *D. pumila* (Metzeltin & Lange-Bertalot), *D. grunowii* (Lange-Bertalot & Metzeltin), *D. dorogostaiskyi* (Skvortzow & Meyer) Metzeltin, Lange-Bertalot & Kulikovskiy, *D. siberica* (Grunow) M. Schmidt, y a algunos especímenes de *D. curvata* (Skvortzow & Meyer) Metzeltin & Lange-Bertalot, debido a que poseen un tamaño y contorno valvar similar pero se diferencian claramente con microscopía electrónica ya que *D. tatrensis* presenta areolas con la oclusión profunda rodeadas por una pared vertical sin espínulas (Mrozińska *et al.* 2016), *D. pumila* presenta una espina pequeña curvada en posición subpolar, no tiene un reborde marginal y la estructura de las areolas es diferente (Metzeltin & Lange-Bertalot 2014), *D. grunowii* presenta una superficie valvar sin ornamentación, areolas apicalmente alargadas con velo dendroide (Metzeltin & Lange-Bertalot 2014), *D. dorogostaiskyi* presenta menor densidad de estrías (7-8 en 10 µm) y varias espinas polares y *D. curvata* presenta areolas alargadas apicalmente y espinas curvadas ubicadas subapicalmente en cada margen valvar sin conectarse a la cresta marginal. En el caso de *D. siberica*, Metzeltin y Lange-Bertalot (2014) señalan que no hay una descripción e ilustración detallada en el trabajo original que describe esta especie y que solo puede ser diferenciada del resto de las especies por algunas de las características morfométricas como número de estrías y rango de longitud.

Por otro lado, Whitton y colaboradores (2009) destacaron que las poblaciones de *D. geminata* en diferentes ríos alrededor del mundo, pueden parecer distintos, al igual que puede haber una considerable diversidad dentro de una pequeña región o incluso una cuenca. La variación significativa en el tamaño de las células de la diatomea en el Río de las Vueltas se encuentra dentro del rango de variación de tamaño de *Didymosphenia geminata* reportado en la literatura para otras regiones del mundo (Krammer & Bertalot, 1986; Whitton *et al.*, 2009; Metzeltin & Lange-Bertalot, 2014; Bishop, 2014; Khan-Bureau *et al.*, 2016), sin embargo, hasta el presente, en Patagonia nunca se había reportado este tipo de células. Estas células son similares en forma a las halladas en Alemania en el Río Isar, en la Isla de Sachalin en Rusia (Metzeltin & Lange-Bertalot, 2014); en los ríos del Himalaya en India (Bhatt *et al.*, 2008) y casi idénticas a las descritas como *Didymosphenia hulli* por Khan-Bureau y colaboradores (2016) para el Río Farmington en Estados Unidos. Contrariamente a lo hallado por Bhatt y colaboradores (2008) en India, en el río de Santa Cruz no se halló una continuidad en el tamaño de las células, sino que se encontraron dos grupos de tamaño de células: las que están en el rango de 54 a 74 µm de largo y las que están en el rango de 120 a 140 µm de largo. Esto podría deberse a que las células se encontraban en un estadio distinto del ciclo de vida de la especie. Según las observaciones de Bishop (2014) en dos sitios diferentes de un mismo río de Estados Unidos, *D. geminata* experimenta la restauración anual de tamaño, aunque no pudo determinar el mecanismo específico del ciclo de vida. Además, sus observaciones mostraron

CAPÍTULO II

2.3. Resultados

2.3.4 Discusión

que la dinámica de la restauración y la distribución de tamaño varían entre los hábitats en el mismo río, lo que demuestra la importancia de la variabilidad espacial. Esto podría explicar las diferencias morfométricas observadas entre los ríos de las provincias de Chubut y Santa Cruz. Por otro lado, las diferencias morfológicas halladas entre las células de mayor tamaño y menor tamaño halladas en Santa Cruz pueden estar relacionadas a la reducción de tamaño por mitosis, por ejemplo especímenes más grandes poseen más estigmas que especímenes más pequeños.

Aunque Metzeltin y Lange-Bertalot (2014) llevaron a cabo una revisión morfológica y morfométrica detallada, todavía hay muchas dudas sobre las especies que están estrechamente relacionados con *D. geminata*. La variación que existe en torno al contorno valvar dentro del ciclo celular dificulta la diferenciación de las especies basándose en datos morfológicos ya que además no se conoce el ciclo celular de todas las especies del género.

En relación a los materiales documentados en América del Sur, los especímenes estudiados son similares a los descritos por Rivera y colaboradores (2013) de Chile, aunque en Argentina encontramos células de mayor y menor tamaño. Rivera y colaboradores (2013) describieron sus especímenes como *D. geminata* morfotipo *capitata*, sin embargo, reconocen que algunas de las características que poseen sus especímenes se diferencian de los descritos por Metzeltin & Lange-Bertalot (1995). Los materiales descritos por Rivera & Gebauer (1989, fig. 54) como *Gomphonema geminatum* en Chile, son similares a *D. clavaherculis*, con constricciones de los polos apical y basal menos marcadas y el polo apical más desarrollado.

Según Stoermer y colaboradores (1986), *Didymosphenia geminata*, tal como estaba delimitada, comprendía varios morfotipos diferenciados geográficamente. Ellos señalan que existen diferencias entre los especímenes de *D. geminata* del Lago Baikal y los de otras poblaciones de otras partes del mundo y consideran que el carácter relacionado con la asimetría del frústulo es el carácter más importante para diferenciar esas poblaciones. Ellos encontraron que todas las poblaciones de *Didymosphenia* halladas en el Lago Baikal tiene un cambio similar de forma con la disminución del tamaño de la célula, siendo diferente a lo que ocurre en otros hábitats. Debido a que el Lago Baikal es uno de los ambientes dulceacuícolas más antiguos y estables, éste sería un carácter primitivo dentro del linaje del género y las diferencias encontradas en otros ambientes se debe a que derivaron de un linaje proveniente del Lago Baikal, que fue dispersado por el mundo. Además, encontraron que el contorno valvar es similar en poblaciones de distintos ambientes pero de una misma región geográfica. Esta podría ser una explicación para las diferencias encontradas entre los especímenes de la Patagonia argentina y especímenes hallados en distintos ambiente de otras regiones como India, Polonia, Rusia, etc. Además, las pequeñas diferencias morfológicas y morfométricas plantean un interrogante acerca del origen de las poblaciones instaladas en la Patagonia argentina. Si

bien la aparición de *Didymosphenia* en los ríos coincide con la presencia de lodges de pesca internacionales o actividades turísticas, los estudios de la estructura fina del frústulo son insuficientes para determinar las posibles vías de invasión y diseminación. La hipótesis más aceptada para explicar la distribución de las floraciones de *D. geminata* a nivel mundial es la que toma como vector al hombre (Kilroy, 2004; Bergey & Spaulding, 2014) pero Bothwell y colaboradores (2014) plantean que la causa de las grandes floraciones involucraría más que la mera introducción de una célula a un cuerpo de agua. Estos autores sostienen que los blooms de *Didymosphenia* ocurridos en los últimos años se deben a cambios en los distintos ambientes del mundo debido a las actividades antrópicas como la quema de combustibles fósiles, urbanizaciones, silvicultura, agricultura entre otras. En base a los resultados generados en este trabajo, nos inclinamos por esta última hipótesis, basándonos en que *Didymosphenia* ya se encontraba presente en la Patagonia (Asprey, 1964; Rivera & Gebauer, 1989) o que la introducción de la especie fue varias décadas antes de que comience a formar floraciones como producto del cambio climático global de la última década.

2.5 Conclusiones

Por todo lo antes mencionado, se considera que en base a los caracteres morfológicos, los materiales de Patagonia pertenecen a *D. geminata* ssp. *geminata*. Sin embargo, no es posible establecer esto con certeza por una parte considerando la gran variabilidad dentro de las especies y subespecies y por otra parte a la variación inter e intrapoblacional observada en los materiales de Argentina.

Si bien desde el punto de vista morfológico podemos considerar que los materiales de Argentina y Chile son conespecíficos, a fin de comprender las variaciones morfológicas y morfométricas que presenta la especie en Argentina y reforzar la identificación taxonómica de los mismos, se realizaron análisis moleculares que trataremos en los capítulos siguientes.

CAPÍTULO III

Un protocolo optimizado para la
extracción de ADN de muestras
bénticas de *Didymosphenia geminata*

UN PROTOCOLO OPTIMIZADO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS BÉNTICAS DE *DIDYMOSPHENIA GEMINATA*

3.1 Introducción

Los estudios morfológicos y ecológicos sobre *Didymosphenia geminata* desarrollados hasta el momento, no nos permiten conocer aún las causas del comportamiento invasivo de esta diatomea. Es por esto, que estudios desde otras perspectivas son necesarios para determinar si las recientes floraciones se deben a la dispersión de una nueva variante genética o al crecimiento de poblaciones locales (Kilroy, 2004; Taylor & Bothwell, 2014). Otros aspectos de la biología de *D. geminata* también se desconocen. Por ejemplo, no se sabe si se desarrollan colonias clonales (es decir, se originan a partir de una sola célula por multiplicación vegetativa) o están formados por la agregación de células libres (Whitton *et al.*, 2009).

Los análisis moleculares basados en el gen ribosomal 18S soportan las observaciones de Kociolek & Stoermer (1988) que agrupan a *Didymosphenia geminata* junto con especies de *Cymbella* basados en características ultraestructurales como posición del núcleo y campo apical de poros no atravesado por la fisura terminal del rafe. Sin embargo, algunos autores consideran que la morfología del frústulo sugiere una relación más cercana con géneros como *Gomphonema* y *Gomphoneis* (Kermarrec *et al.*, 2011).

La obtención de ácidos nucleicos con un alto grado de pureza y un alto rendimiento de PCR a partir de muestras ambientales es un paso crítico para desarrollar estudios genéticos. Las muestras de mata de *D. geminata* plantean un desafío debido a la alta proporción de pedúnculos en relación a las células, así como la gran cantidad de polisacáridos que poseen estos pedúnculos, que son conocidos por ser potentes inhibidores enzimáticos (Monteiro *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 1996). Existen reportes previos sobre purificación de ácidos nucleicos a partir de *D. geminata* (Cary *et al.*, 2006, 2007, 2014; Kelly 2009; Kermarrec *et al.*, 2011). Cary y colaboradores (2007) compararon seis kits de extracción de ADN de cuatro empresas comerciales diferentes, observando tasas de éxito de amplificación de ADN aceptables pero variables. A pesar de esto, las comparaciones de desempeño que se logra mediante técnicas de extracción de ADN convencionales, así como el desarrollo de nuevos enfoques diseñados específicamente para matas de *D. geminata* son insuficientes.

El objetivo de este capítulo es evaluar cuál es la técnica de extracción de material genético óptima para llevar a cabo estudios moleculares en este género. Para esto se compararon cinco métodos de extracción de ácidos nucleicos sobre muestras bentónicas. Estas técnicas han sido

utilizadas anteriormente para obtener ADN en diversos estudios genéticos que implican una amplia variedad de organismos, tales como diatomeas (Iwatani *et al.*, 2005), dinoflagelados (Richlen & Barbar 2005), copépodos (Simonelli *et al.*, 2009), bacterias, virus y picoeucariontes (Manrique *et al.*, 2012; Manrique & Jones, 2014), arañas (Casquet *et al.*, 2012) y células nucleadas humanas (Miller *et al.*, 1988). Todas las técnicas consideradas utilizan en términos generales los productos químicos ampliamente disponibles, y pueden reproducirse en cualquier laboratorio. Un nuevo protocolo fue diseñado basado en las características física y química de los protocolos estudiados para obtener de ADN de mejor calidad a partir de matas de *D. geminata*. La posibilidad de contar con un método normalizado, rápido y sencillo que permite la purificación de ADN alto peso molecular de cualquier muestra enviada al laboratorio (es decir, desde muestras simples de agua a complejas que albergan matas con potenciales inhibidores de enzima) ayudará a obtener información molecular de mejor calidad que permitira una mejor comprensión del comportamiento de este alga.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Diseño de muestreo

Las muestras destinadas a realizar los análisis moleculares fueron recolectadas en los mismos sitios que para los análisis morfológicos (Fig. 5) e inmediatamente colocadas en solución de preservación. Tomando en cuenta las distancias que existen entre los lugares de muestreo y el Laboratorio de Virología y Genética Molecular en la UNPSJB sede Trelew donde se realizaron los estudios moleculares, se utilizaron dos medios de preservación con el fin de evaluar cuál de ellos permite el mejor transporte, conservación y mayor recuperación del material genético de las mismas. Se utilizó: etanol al 70% y solución de CTAB (2% CTAB, 1.4 M ClNa, 20 mM EDTA y 100 mM Tris-HCl pH 8.0) (para ver preparación de soluciones Anexo I). En cada estación se tomó con pinzas una muestra a partir de aquellas rocas que presentaron menor contenido de detritos y materia orgánica entre el mucílago generado por *D. geminata*. El material se colocó en tubos Falcon de 50 ml conteniendo 35 ml de preservante aproximadamente. Los puntos de muestreo se seleccionaron en función de las características macroscópicas de la especie. En el laboratorio las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su análisis. Inmediatamente después de llegar al laboratorio, se realizaron observaciones microscópicas utilizando una magnificación de 400X para corroborar la presencia de células *D. geminata* (Olympus CKX41 microscopio) y se fotografiaron con cámara Olympus E-330.

En todos los casos los muestreos se realizaron siguiendo las pautas de seguridad recomendadas a nivel nacional e internacional considerando que se trata de una especie invasora (Duncan *et al.*, 2007; Casco & Sala, 2011).

3.2.2 Extracción y purificación de ADN genómico total de *Didymosphenia geminata*

Extracción de ADN

Para obtener ADN de muestras ambientales de *D. geminata* fueron utilizados cinco protocolos de extracción directa de ácidos nucleicos. Para cada extracción de ADN, una porción de 50 mg de muestra de campo de *D. geminata* fue centrifugado y posteriormente el sobrenadante fue removido. El sedimento obtenido se lavó con 150 ml de agua pura (BioPak) para remover el etanol residual inmediatamente antes de comenzar con el procesamiento de las muestras. Todos los protocolos estudiados aquí se basan en una serie de principios físico-químicos y compuestos químicos: i) extracción orgánica combinada con una digestión con proteinasa K y precipitación de ácidos nucleicos (Sambrook & Russel, 2001); ii) tratamiento con una resina quelante de intercambio iónico (Chelex® 100, BioRad) que ha demostrado ser útil en muestras de difícil extracción de ADN; iii) tratamiento con una alta concentración de un surfactante tensioactivo aniónico (bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB); iv) tratamiento con una alta concentración de proteinasa K, seguido de una extracción orgánica y un paso de precipitación salina y, v) la técnica de precipitación salina, combinada con un tratamiento con proteinasa K. Las principales características de estos cinco métodos se detallan en la Tabla 4.

Además, basado en el hecho de que el mucílago de *D. geminata* acumula cantidades significativas de metales (Bothwell *et al.*, 2012; Sundareshwar *et al.*, 2011) y en el rendimiento mostrado por el protocolo de CTAB descrito en las siguientes secciones, un procedimiento mejorado fue desarrollado combinando CTAB y Chelex-100. Los detalles de los seis protocolos se describen a continuación (Ver Anexo I para preparación de Soluciones):

1. Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Manrique *et al.*, 2012)

Los pellets fueron incubados a 60 °C durante 1 h en 700 µL de buffer CTAB pre calentado (2% CTAB Sigma, 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) con 0.3 µg/µL de proteinasa K. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 4 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante obtenido fue transferido a nuevos tubos. Luego del tratamiento con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), el ARN presente en la suspensión fue digerido con ARnasa A (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 10 µg/mL durante 1 h a 37 °C. El ADN fue precipitado con isopropanol frío por 1 h. a 4 °C y luego centrifugado a 21,000 xg por 30 min a 4 °C (Sorval Legend Micro 17 R, Thermo Scientific). Los pellets de ADN fueron lavados con etanol 70%, secados y resuspendidos en 10 µL de agua ultrapura, libre de ADNasa (Invitrogen).

2. Salting out (SO) (Miller *et al.*, 1988)

Los pellets de muestra se resuspendieron en 600 µL de buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,2,

CAPÍTULO III

3.2 Materiales y Métodos

3.2.2 Extracción y purificación de ADN

CINa 400 mM y 2 mM Na₂EDTA), 40 µl de SDS 10% y 100 µL de una solución de proteinasa K (1 mg/mL de proteinasa K en SDS al 1%, 2 mM Na₂EDTA), y se incubó a 37 °C durante la noche. Después de la incubación, se añadieron 200 µL de una solución saturada de CINa (~ 6 M) a cada tubo, se agitó vigorosamente durante 15 seg. y se centrifugó durante 15 min. a 16.873 xg (Centrífuga 5418, Eppendorf). El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se añadió etanol 100% a temperatura ambiente. Los tubos se invirtieron varias veces hasta que el ADN se precipitó, y luego se centrifugó a 16.873 xg durante 3 min. Los pellets de ADN se secaron al aire y se resuspendieron en 10 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM Na₂EDTA, pH 7,5).

3. Chelex 100 (CH)

Se preparó una suspensión de Chelex-100 (Bio-Rad) al 10% siguiendo las indicaciones del fabricante. Se añadieron 300 µL de esta suspensión a cada muestra, se mezclaron vigorosamente con vortex durante aproximadamente 5 seg. y se centrifugaron brevemente. Las muestras fueron calentadas a 100 °C durante 10 min, se mezclaron con vórtex y se centrifugaron nuevamente. Finalmente se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4. Cloruro de Litio (CILI) (Kelly, 2009)

Las muestras fueron incubadas a 55 °C durante 2 hs. y luego a 37 °C toda la noche en una mezcla combinando 300 µL buffer de lisis (700 mM Tris-HCl, pH 9; 1% SDS; 50 mM EDTA, pH 8; 100 mM CINa) y 25.5 µL de una solución de 20 mg/ml de proteinasa K. Luego, las muestras fueron tratadas con 300 µL de CILI 5 M y 645 µl de cloroformo por 45 min. El ADN fue precipitado añadiendo un volumen de isopropanol a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 16,873 xg durante 10 min. El pellet obtenido fue secado y resuspendido en 10 µL de agua ultrapura libre de ADNasa (Invitrogen).

5. Extracción orgánica, (EO) (Sambrook & Russel, 2001)

Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante la noche con 400 µL de buffer de proteinasa K (10 mM Tris-HCl pH 7,8, EDTA 5 mM, 0,5% SDS) y 1 µL de una solución de proteinasa K 20 µg/µL. Posteriormente, los ácidos nucleicos fueron extraídos mediante la adición de un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25: 24: 1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 16873 xg. Los restos de fenol fueron removidos por una segunda extracción con cloroformo. Los ácidos nucleicos contenidos en la fase acuosa fueron precipitados mediante la adición de acetato de sodio (3 M; pH 5,2) y etanol al 100%, antes de la centrifugación a 16.873 xg durante 5 min. El pellet obtenido fue lavado con etanol 70%, secado y resuspendido en agua ultrapura libre de ADNasa (Invitrogen).

6. Bromuro de Cetiltrimetilamonio- Chelex-100, (CTABCH) (este estudio)

Este protocolo ha derivado de los protocolos CTAB y Chelex-100 descritos anteriormente. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 1 h en 700 µL de buffer CTAB pre-calentado (2% CTAB Sigma, M ClNa1,4, 0,2% β-mercaptoetanol, EDTA 20 mM, 100 mM Tris-HCl pH 8,0), 10% Chelex-100 (Bio-Rad) y 0,3 µg/µl de proteinasa K. Después de la digestión, las muestras se centrifugaron durante 4 min a máxima velocidad y los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a tubos nuevos. El resto del protocolo sigue siendo el mismo que el CTAB descrito anteriormente.

Tabla 4. Comparación de los cinco métodos¹ de extracción de ADN estudiados.

VARIABLEC	SO	EO	TAB	CHELEX	CILi
Quelante	-	-	-	Chelex 100	-
Salting Out	~1.5M ClNa	-	1.4 M ClNa	-	2.5M CILi
Surfactante	No	No	catiónico	No	No
Digestión³	PK (~0.1µg/µl)	PK (~0.05 µg/µl)	PK(~0.3 g/µl) y RNasa A	No	PK (~1.5 µg/µl)
Solventes²	-	F:C:I + C	C:I	-	C-CILi
Sal	~1.5M ClNa	0.3 M AcNa	1.4 M ClNa	-	2.5M CILi
Alcohol⁴	Etanol	Etanol	Isopropanol	-	Isopropanol
Lavado	No	70% etanol	70% ethanol	-	No
Buffer de conservación	TE ⁵	H2O	H2O	-	H2O

¹ Salting out SO; extracción EO; Bromuro de Cetyltrimethylamonio CTAB; Chelex-100 Chelex; Cloruro de Litio CILi.

² Solventes usados en la extracción orgánica. C:I: Cloroformo:alcohol isoamílico; C-CILi: Cloroformo combinado con CILi; F:C:I + C: Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico más una segunda extracción con cloroformo.

³ Sal proveniente de cationes en la precipitación de ácidos nucleicos

⁴ Alcohol usado para la precipitación de ácidos nucleicos.

⁵ Solución Tris-EDTA

Análisis de las suspensiones de ADN

La calidad de los ácidos nucleicos obtenidos se evaluó por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotométricamente a diferentes longitudes de onda (230, 260, 280 y 320 nm) utilizando un espectrofotómetro Nanovue Plus (GE Healthcare). La electroforesis se realizó con 0,8% de agarosa en buffer TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8), se tiñeron con bromuro de etidio (concentración final 0,5 g / mL) y se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador (Elettrofor). Para la cuantificación de ADN, las imágenes de los geles fueron digitalizadas utilizando una cámara y equipos de documentación (Biodinámica, Kodak, DOC-6490), y el

rendimiento de ADN se estimó mediante análisis densitométrico contra estándares de 10, 20, 30, 40, 60 y 100 ng de ADN (High Mass Lader DNA, Invitrogen) utilizando el software ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004).

Condiciones de amplificación de ADN

Se obtuvo una amplificación parcial del gen 18S rDNA de *D. geminata* utilizando los primers específicos 602F y D1670R, que fueron diseñados para amplificar una región de 1068 pb (Cary *et al.*, 2006, 2014). Para todos los pares de oligonucleótidos se llevó a cabo una optimización de las temperaturas de annealing en las reacciones de PCR. Para llevar a cabo la optimización se realizaron reacciones de PCR en gradientes de temperatura (Ishii & Fukui, 2001). Éste procedimiento nos permitió evaluar la temperatura óptima que permitió obtener el fragmento de tamaño esperado en ausencia de bandas inespecíficas, y cantidad óptima del amplicón obtenido (Fig. AII.1). Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler con la opción de gradiente (BioRad). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en una reacción de 50 μ L que contienen 1 μ L de extracto de ADN diluido, 1,25 unidades de ADN polimerasa GoTaq® (Promega), 10 μ L de Buffer 5X GoTaq y 1 μ Mol de cada primer específico. Las condiciones de ciclado fueron: paso inicial a 94 °C durante 1 min seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 seg., 52,1 °C durante 30 seg. y 72 °C durante 90 seg.; y una etapa de extensión final de 72 °C durante 5 min. Todos los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con buffer TAE 1X como se ha descrito antes. Los productos de PCR visualizados se analizaron por densitometría como se describe anteriormente.

3.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

Para cada método de extracción, se realizaron veinticuatro extracciones de ADN independientes utilizando 50 mg de la muestra de campo obtenida como se describió anteriormente. Con el fin de confirmar la separación exitosa del contenido celular de los frústulos, todas las muestras se analizaron mediante observación microscópica después del correspondiente tratamiento.

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Hollander & Wolfe, 1999). Esta prueba supone dos muestras aleatorias X_1, \dots, X_m e Y_1, \dots, Y_n extraídas de poblaciones continuas, independientes entre sí con funciones de distribución F y G , respectivamente. El objetivo es evaluar la existencia de cualquier diferencia de distribución de probabilidad entre el X e Y , es decir, probar la

hipótesis nula:

$H_0: F(t) = G(t)$; para cada t ;

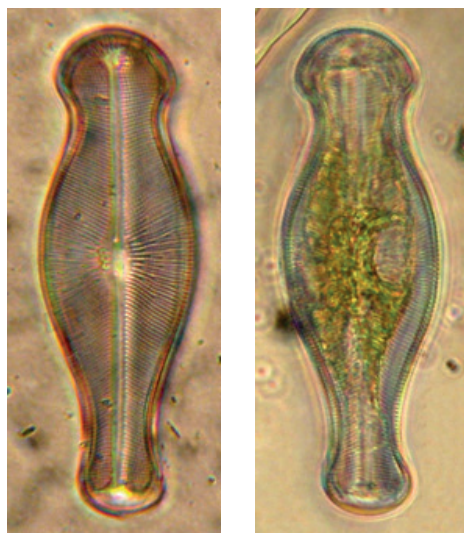
Contra la alternativa más general posible:

$H_0: F(t) \neq G(t)$; para al menos una t .

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el estadístico R versión 2.15.1 (desarrollo R Core Team, 2013).

3.3 Resultados

Las observaciones microscópicas mostraron que todas las extracciones de ADN a través de los distintos métodos permitieron con éxito el desprendimiento del contenido citoplasmático de las células (Fig. 22). Para los métodos de CTAB, CTABCH y EO, el ADN total fue detectado en todas las muestras procesadas por análisis de electroforesis en gel. Para el método CILi y SO, 23 y 21 muestras tenían ADN detectable en geles de agarosa. En todos los casos, el ADN podía ser visualizado como ADN de alto peso molecular (fragmentos > 10 kpb). No hubo ADN detectable en las suspensiones obtenidas por el método CH (Fig. AII.2).



22.A

22.B

Fig. 22 / MO. *D. geminata* antes (**A**) y después (**B**) del procedimiento de extracción de ADN. La célula que se muestra en **B** corresponde a una muestra tratada con Chelex-100. El resto de las técnicas produjeron resultados equivalentes (no mostrado). Ampliación: 400X.

En general, los análisis espectrofotométricos indicaron que el grado de pureza de ADN era ligeramente menor a los intervalos óptimos. Muchas de las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} estaban por debajo de 1,7 (el óptimo es entre 1,7 y 2,0) y la mayoría de los extractos muestran absorbancias considerables cuando se mide a longitudes de onda

de 230, 280 y 320 nm (Tabla 5, Fig. 23). No obstante, muchas de las extracciones obtenidas por los métodos de EO, CTAB y CTABCH muestran tasas medias A260/A280 cercanas o por encima de 1,7 (Tabla 5; Fig. 23). El resto de los métodos mostró tasas A260/A280 significativamente más bajas, que indican un grado de pureza más bajo del ADN en relación con los métodos EO, CTAB y CTABCH ($p < 0,035$, prueba de Kolmogorov-Smirnov, Tabla 5, Fig. 23).

Tabla 5: Absorbancias de los extractos obtenidos por los seis métodos de extracción de ADN estudiados¹.

MÉTODO	ABSORBANCIAS ²			
	A230	A260	A280	A320
SO	5.91(14.5)	4.99(8.2)	3.99(7.4)	2.42(5.5)
EO	2.29(1.2)	3.46(1.5)	2.21(1.0)	0.62(0.6)
CTAB	3.24(1.2)	3.22(1.6)	2.9(1)	0.70(0.6)
CHELEX	3.44(4.3)	2.06(4.2)	1.64(4.2)	1.30(3.7)
CILI	9.73(3.3)	7.78(2.5)	6.35(2.2)	4.35(1.8)
CTABCH	3.92(1.8)	6.09(3.2)	3.57(1.8)	0.95(1.2)

¹Salting out (Precipitación salina) SO; extracción orgánica EO; Bromuro de Cetyltrimethylamonio CTAB; Chelex-100 Chelex;

protocolo Cloruro de litio LiCl; Bromuro de Cetyltrimethylamonio y Chelex-100 CTABCH.

² Media (desviación estándar).

Las cantidades de ADN obtenidas por los protocolos de CTAB, CTABCH y EO fueron significativamente mayores que las cantidades de ADN obtenidos mediante CILI y SO ($p < 5 \times 10^{-4}$, prueba de Kolmogorov-Smirnov; Fig. 24). Los rendimientos de ADN obtenidos mediante técnicas de EO y CTAB fueron estadísticamente indistinguibles. En comparación con estas dos técnicas, el método CTABCH resultó en cantidades ligeramente mayores de ADN ($p < 0,05$ prueba Kolmogorov-Smirnov; Fig. 24). Como se mencionó anteriormente, las preparaciones obtenidas por el método CH presentaron cantidades no detectables de material genético, lo que impide la cuantificación de ADN. En base a los resultados espectrofotométricos, para las muestras estudiadas aquí, la absorbancia a 260 nm era un indicador inadecuado de la cantidad de ADN presente en los extractos. De hecho, los análisis de regresión y correlación indicaron que absorbancias a 260 no se correlacionaron con las concentraciones de ADN estimadas por los análisis de densitometría (Tabla 6, Fig. 25). Por lo tanto, se desestimaron las determinaciones de rendimiento de ADN en base a A260.

CAPÍTULO III

3.3 Resultados

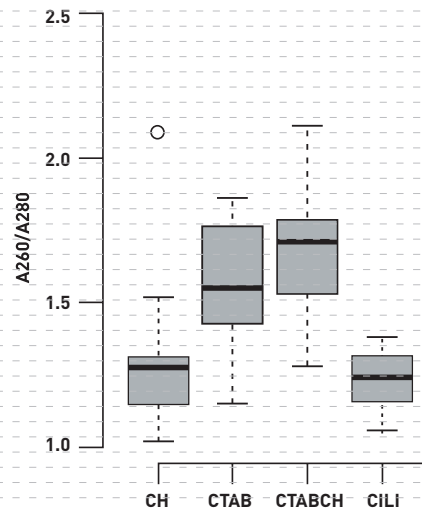


Fig. 23 / Box plot de la razón de absorbancias a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}) observadas para las preparaciones de ADN obtenidos por los seis métodos estudiados. CH: Chelex-100, CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio, CTABCH: bromuro de cetiltrimetilamonio y Chelex-100, EO: extracción orgánica, CILi: protocolo de cloruro de litio, y SO: precipitación salina.

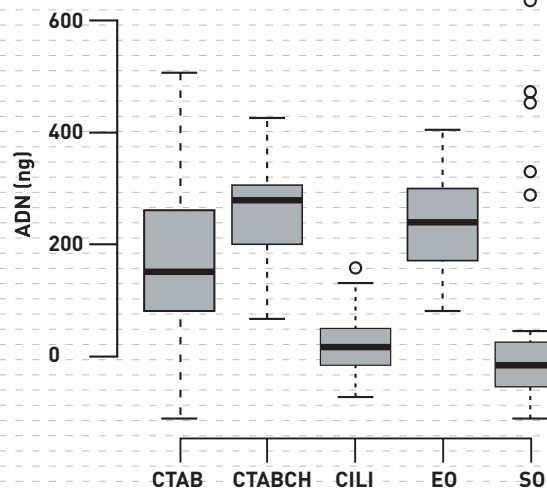


Fig. 24 / Box plots de las concentraciones de ADN de las preparaciones de ácidos nucleicos obtenidas por las técnicas de purificación de ADN evaluados en este estudio ($N = 24$). EO: extracción orgánica, CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio, CTABCH: bromuro de cetiltrimetilamonio y Chelex-100, CILi: protocolo de cloruro de litio, y SO: precipitación salina. La presencia de valores negativos obedece al hecho de que algunas muestras presentan cantidades de ADN que caen fuera de la gama de la masa estándar utilizada para la calibración.

Bajo las condiciones experimentales descritas, las muestras de ADN obtenidas por los métodos de CILi y CH resultaron en productos de PCR no detectables. Once de las muestras obtenidas por la técnica de SO también dieron productos de amplificación no detectables, mientras que el resto de amplificaciones llevadas a cabo a partir de estos extractos dieron un mínimo de 91,5 ng y un máximo de 1246.9 ng de producto de PCR. El rendimiento medio obtenido por PCR a partir de los extractos fue 376,3 ng, con una desviación estándar de 448,4. El rendimiento promedio de PCR observado para las preparaciones de ADN obtenidas por el protocolo EO fue 379,9 ng, con una desviación estándar de 21,09; solo una de las réplicas del protocolo EO dio lugar a productos de amplificación no detectables. El mayor rendimiento de PCR observado para esta técnica fue de 777,8 ng. Todos los extractos obtenidos por los protocolos de CTAB y CTABCH resultaron en las reacciones de PCR positivos. Las suspensiones de ADN obtenidos por CTAB muestran un rendimiento medio de PCR de 382,4 ng con una desviación estándar de 282,1 y con rendimientos mínimos y máximos de 49,8 ng y 1125 ng respectivamente. Las suspensiones obtenidas por CTABCH tenían un rendimiento medio de PCR de 1491,0 ng y una desviación estándar de 554,8. Las cantidades más pequeñas y más grandes de ADN obtenidos por PCR a partir de los extractos CTABCH fueron de 298,6 ng y 2215,0 ng respectivamente. Los rendimientos observados para PCR del protocolo mejorado descrito en este trabajo fueron significativamente más altos que los rendimientos observados por el resto de protocolos ($p < 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov; Fig. 26).

Tabla 6. Relación¹ entre la cantidad de ADN presente en las suspensiones de ADN obtenidas por los métodos estudiados² y la absorbancias a 260 nm.

	SO	EO	CTAB	CILi	CTABCH
β	1E-3 (0.95)	0.019 (0.12)	-0.016 (0.41)	-0.003 (0.58)	0.014 (0.01)
R^2	9E-4	0.103	0.040	0.044	0.26
s	0.031 (0.95)	0.103 (0.12)	0.040 (0.41)	0.044 (0.58)	0.260 (0.01)

¹ Pendiente estimada (valor- p ; t-test); R-cuadrado; coeficiente de correlación-producto momento de Pearson (valor- p ; F-estadístico).

² Salting out (Precipitación salina) SO; Extracción orgánica EO; Bromuro de Cetyltrimethylamonio CTAB; Chelex-100 Chelex; protocolo Cloruro de litio LiCl; Bromuro de Cetyltrimethylamonio y Chelex-100 CTABCH. No fue posible determinar la cantidad de AND obtenido a través del método Chelex-100.

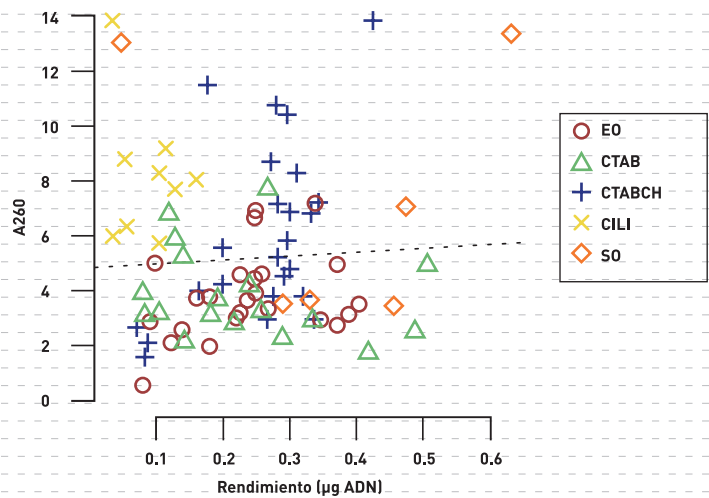


Fig. 25 / Diagrama de dispersión de cantidad de ADN frente a la absorbancia a 260 nm (A260) de los extractos de ADN obtenidos por los seis métodos estudiados aquí. EO: extracción orgánica, CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio, CTABCH: bromuro de cetiltrimetilamonio y Chelex-100, CILI: protocolo de cloruro de litio y SO: precipitación salina. Las muestras que muestran cantidades de ADN que quedan fuera del rango utilizado para calibrar la curva fueron desestimadas. Las líneas discontinuas corresponden a los modelos lineales empotrados (ver también Tabla 6).

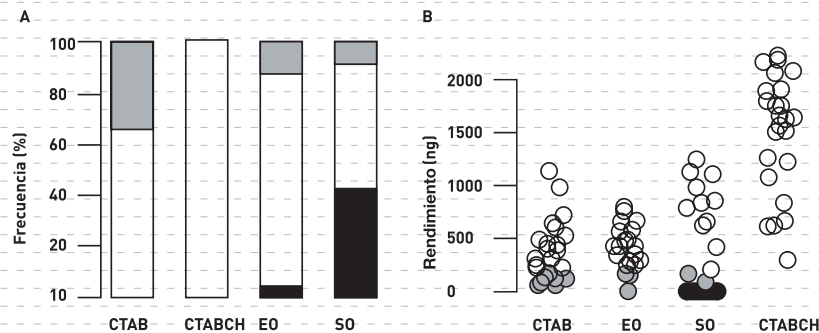


Fig. 26 / Rendimiento de la amplificación de muestras de ADN obtenido por bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), extracción orgánica (OE), precipitación salina (SO) y el protocolo que combina los métodos Chelex-100 y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABCH). Las tasas de eficacia de la PCR se muestran en la figura **A**. Blanco: PCR que produjeron más de 20 ng de ADN por 5 µL; negro: amplificación no detectable; grises: PCR que producen menos de 20 ng de ADN por 5 µL. La figura **B** corresponde a las eficiencias de amplificación.

Las cantidades de DNA molde que se utilizaron en las reacciones de PCR no se correlacionaron con los rendimientos correspondientes de PCR (Fig. 27), con la excepción de las ampliificaciones de PCR realizadas a partir de los extractos de ADN obtenidos por el protocolo CTABCH ($p=3.085e-5$, $R^2=0,74$, coeficiente de correlación momento de Pearson; Fig. 27).

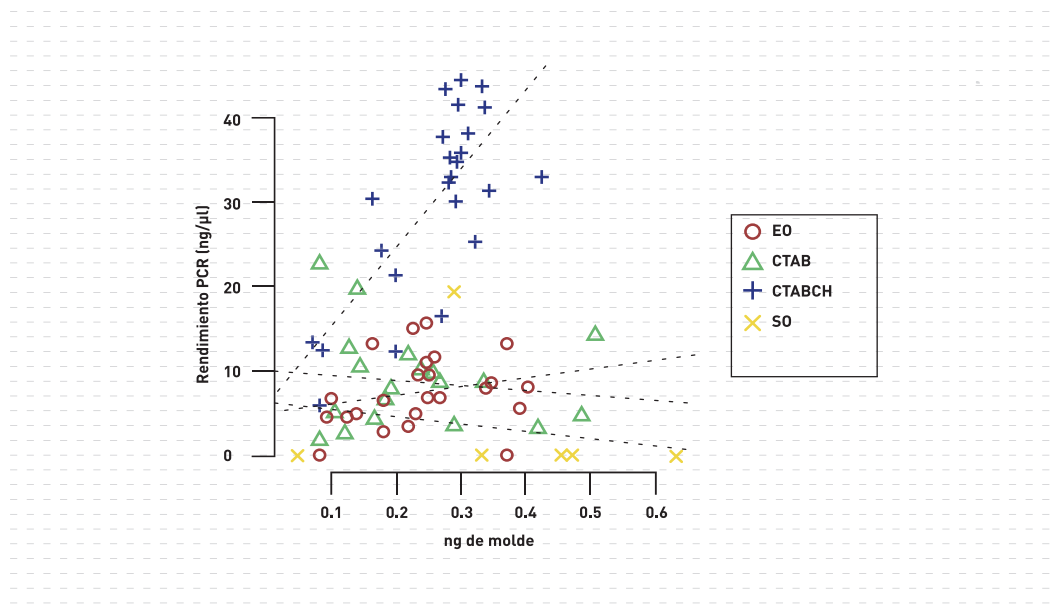


Fig. 27 / Relación entre la cantidad de ADN molde usado en cada reacción de PCR y los rendimientos de ADN correspondientes. Las líneas discontinuas corresponden a los modelos lineales empotrados para cada protocolo de extracción de ADN.

3.4 Discusión

A partir de la comparación de seis protocolos de extracción de ADN directa en términos de su capacidad para la obtención de cantidades de ADN obtenido de alta pureza y su eficacia y eficacia en las ampliificaciones por PCR, observamos que las suspensiones de ADN obtenidas por métodos OE, CTAB y CTABCH mostraron los rendimientos más altos en cuanto a la cantidad de ADN, junto con las mejores calidades. Sin embargo, en promedio, la relación A260/A280 fue de 1,65, con sólo el 29,1% de estos extractos entre 1,7 y 1,9, que corresponden a preparaciones de ADN de alta calidad (Sambrook & Russel, 2001). Un escenario equivalente se observó para los valores obtenidos a longitudes de onda 230 y 320 nm, lo que indica la presencia de inhibidores como sales o disolventes, y material particulado, respectivamente. Estos datos están de acuerdo con los observados para la preparación de ADN obtenidas a partir de muestras ambientales complejas que contienen altas cantidades de materiales contaminantes o sustancias poliméricas extracelulares (Bey *et al.*, 2010; Sharma

et al., 2014). Además, aunque todos los métodos probados permitieron separar el contenido celular del frústulo de *Didymosphenia* (Fig. 22), 33% de los extractos no muestran cantidad visible de ADN en geles de agarosa, mientras que el rendimiento por mg de pedúnculo para el resto de los extractos varió entre 9,8 pg a 12,64 ng (media 4,2 ng; desviación estándar 2,69). Estos rendimientos de ADN son comparables a los observados para materiales recalcitrantes tales como algunos tejidos vegetales de herbarios momificados ya que dejan altos niveles de compuestos secundarios y microbianos, con rendimientos mucho más bajos que los ADN obtenidos con los tejidos más susceptibles de extracción de ADN (Aljanabi & Martínez, 1997; Bey *et al.*, 2010; Cota Sánchez *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 1990; Porebski *et al.*, 1997; Rogers & Bendich, 1985). La explicación más probable para los bajos rendimientos observados podría ser la alta proporción de mucílago en relación a las células presentes en las matas de *D. geminata*, aunque otros problemas podrían estar ocurriendo como veremos a continuación.

En aplicaciones en biología molecular, como en el estudio del rendimiento en las reacciones enzimáticas tales como la PCR, es de suma importancia la evaluación de las preparaciones de ADN. En este trabajo, la inhibición de la PCR fue bastante frecuente para varios de los protocolos estudiados, resultando el 41,6% de las muestras, sin productos de amplificación. Todas las reacciones de PCR realizadas con los extractos de ADN obtenidos por los protocolos CTAB y CTABCH desarrollado aquí, fueron exitosas. Sin embargo, los rendimientos de los productos de la PCR observados para las muestras de CTAB no se correlacionaron con las cantidades de ADN molde correspondiente (Fig. 27). Este no fue el caso para las muestras obtenidas por nuestro protocolo mejorado, para el que se observó una correlación clara entre las cantidades de ADN molde y los correspondientes rendimientos de PCR ($p = 3.08e-05$, prueba de coeficiente de correlación producto momento de Pearson; Fig. 27), aunque el coeficiente de R-cuadrado fue de 0,5332, lo que indica un pobre ajuste del modelo. Estos resultados, combinados con la ausencia de una meseta evidente en los rendimientos de PCR (Fig. 27), apoyan la idea de que la razón más probable de la no detección de producto de PCR es la persistencia de inhibidores de la PCR en los extractos de ADN. Un factor que podría explicar la inhibición enzimática son los altos contenidos de polisacáridos de los pedúnculos, ya que los polisacáridos pueden ser potentes inhibidores enzimáticos (Monteiro *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 1996). Los protocolos que utilizan buffers con altas concentraciones de sales son conocidos por facilitar la eliminación de polisacáridos (Porebski *et al.*, 1997), lo que podría explicar las diferencias en el rendimiento observado entre el protocolo de EO y los protocolos CTAB y CTABCH (Tabla 4; Figs. 26 y 27). Por otro lado, se ha demostrado que el mucílago de *D. geminata* acumula cantidades significativas de hierro (Bothwell *et al.*, 2012; Sundareswarar *et al.*, 2011). Se cree que los compuestos de hierro y metales pesados, en general, interfieren con las reacciones de amplificación mediante la inhibición de la actividad enzimática o dañando el

ADN. Esto ha llevado a otros autores a incluir Chelex 100 en sus protocolos de extracción de ADN, ya que puede secuestrar cationes de metales pesados (Abramoff *et al.*, 2004; Aldrich & Cullis, 1993). El método combinado CTABCH descrito aquí superó al protocolo CTAB en rendimiento de PCR, que atribuimos a la eliminación de hierro (Figs. 26 y 27). Esto podría parecer contradictorio con lo que hemos observado durante el protocolo de CH, sin embargo, que el protocolo CH haya fallado puede ser explicado por las cantidades relativamente pequeñas de ADN molde presentes en las extracciones de ADN por este método en relación a los otros protocolos (para el protocolo CH el ADN se concentró en un volumen de 300 μ L, mientras que para el resto de los protocolos el ADN se resuspendió en 10 μ L). Se ha sugerido que el tratamiento estándar con Chelex es demasiado suave para la lisis eficiente de los frústulos de sílice de las diatomeas (Simonelli *et al.*, 2009), pero esto no está de acuerdo con nuestras observaciones (Fig. 1). Como en el caso del protocolo CH, los extractos de ADN obtenidos por el método CILi no pudieron ser amplificados. En comparación con los protocolos SO, CTAB y CTABCH, el protocolo de CILi utiliza una mayor cantidad de sal para la etapa de salificación y utiliza litio, en lugar de sodio, como el catión monovalente para la precipitación de ADN. Además, no incluye una etapa de lavado después de la precipitación de ADN (Tabla 4). Por lo tanto, se hipotetizó que la alta potencialidad salina utilizada en la etapa de precipitación salina del protocolo CILi podría interferir con el tratamiento de la proteinasa K, a causa de su precipitación. Además, la ausencia de una etapa de lavado podría causar que sales u otros reactivos utilizados en el procedimiento de purificación persistan en los extractos de ADN produciendo una evidente interferencia en la amplificación enzimática (Al-Soud & Rådström, 2001).

Estos resultados soportan el concepto de que las muestras bentónicas de *D. geminata* son fuentes recalcitrantes de ADN tanto en términos de rendimiento de ADN como de potencial persistencia de inhibidores enzimáticos. Para este tipo de muestras complejas son frecuentemente utilizados los métodos de extracción de ADN indirecta que implica la separación de células antes de la extracción de ácido nucleico (Bey *et al.*, 2010) o procedimientos de muestreo selectivo (Cary *et al.*, 2014). Los procedimientos indirectos permiten la exclusión de la matriz de fondo y contaminantes, así como la presencia de otros microorganismos presentes en la muestra. En este sentido, otras fuentes de ADN están presentes en las muestras de mata de *D. geminata*, un hecho que podría ser interpretado como una desventaja para los estudios moleculares del alga debido a la presencia de ADN no esencial. Esto podría colocar a los extractos de ADN obtenidos por nuestro método mejorado en un lugar ventajoso, dado que el ADN metagenómico obtenido de las muestras ambientales de *D. geminata*, podría contribuir a realizar estudios con más profundidad. En efecto, informes recientes han sugerido que la estructura bacteriana en comunidades del biofilm de *D. geminata* puede estar asociada con el establecimiento y la supervivencia del alga invasora (Kuhajek & Wood, 2013).

En este estudio, se demostró que los protocolos de extracción de ADN directa que (i) utilizan buffers de lisis que incluyen tensioactivos aniónicos tales como CTAB; (ii) aplican buffers con altas concentraciones salinas con el fin de facilitar la eliminación de polisacáridos, (iii) incluyen etapas de lavado después de la precipitación de ADN e (iv) incorporan agentes quelantes; podrían ayudar a superar o al menos mejorar las dificultades planteadas por el alga bentónica *D. geminata* para aplicaciones moleculares. El protocolo de extracción de ADN optimizado desarrollado en base a estos puntos, superó al resto de los protocolos estudiados aquí, y tiene el potencial de constituir una muy buena herramienta para futuros estudios genéticos del alga y la biota asociada.

CAPÍTULO IV

Diversidad genética de
Didymosphenia geminata de la
Patagonia sur Argentina

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *DIDYMOSPHENIA GEMINATA* DE LA PATAGONIA SUR ARGENTINA

4.1 Introducción

Si bien en algunos ríos septentrionales la diatomea colonial *Didymosphenia geminata* ha sido históricamente muy abundante (Ellwood & Whitton, 2007), en muchas regiones del mundo hay pocos registros anteriores al año 2004. Por ejemplo, para Sudamérica existen dos reportes anteriores a 2010, en el cual la especie fue clasificada entre las “especies muy raras” (Asprey *et al.*, 1964; Rivera & Gebauer, 1989). Sin embargo, a partir de los años 80 comenzaron a registrarse floraciones de *D. geminata* en el mundo, las cuales en algunos sitios fueron consideradas como potencialmente perjudiciales para el hombre y el medio ambiente dada su magnitud (Ellwood & Whitton, 2007, y citas en dicho trabajo; Blanco & Ector, 2009). La aparición de floraciones masivas de *D. geminata* en Nueva Zelanda en 2004, y la asunción de que las mismas fueron consecuencia de una invasión biológica (Biggs *et al.*, 2006; Kelly, 2009), han conducido a la aceptación de que la especie ha invadido otras regiones del mundo.

Si bien muchos ríos han sido estudiados con la suficiente profundidad como para poder aseverar que han ocurrido incrementos en la abundancia la especie (Whitton *et al.*, 2009; Sastre *et al.*, 2013), la hipótesis de la invasión aun no ha sido comprobada. De hecho en algunos lugares las floraciones de *Didymosphenia* han disminuido (Kawecka & Sanecki, 2003). Por otro lado, como se ha mencionado en el Capítulo I, existen evidencias que sugieren que las floraciones de *D. geminata* podrían deberse a su capacidad de utilizar fosfato orgánico en sitios con concentraciones elevadas (Ellwood & Whitton, 2007). La actividad de fosfatasas de superficie en organismos acuáticos autótrofos es un indicador de que existen limitaciones en la disponibilidad de P o bien de que la única fuente de P disponible es orgánica. Ellwood & Whitton (2007) observaron actividades elevadas de fosfatasas en coincidencia con el mayor desarrollo de la especie y las máximas concentraciones de fosfato orgánico. La máxima actividad fosfatasa fue observada en los extremos de los pedúnculos pero no en las células. Esto, junto con el hecho de que se ha observado que durante las floraciones las tasas de división de *D. geminata* pueden disminuir un 60%, mientras que el largo medio de los pedúnculos puede aumentar un 250% (Kilroy & Bothwell, 2011), sugiere que la especie podría poseer una ventaja cuando hay baja disponibilidad de P inorgánico y altas concentraciones de P orgánico. La importancia del P también ha sido estudiada por Kilroy & Bothwell (2012) y en dos recientes trabajos que revelaron una asociación significativa entre la disponibilidad de P y el desarrollo de *Didymosphenia* (Montecino *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2016). Todos estos datos soportan la idea

de de la disponibilidad de P, posiblemente en respuesta a cambios climáticos, podría explicar las recientes floraciones, tal como fue originalmente propuesto por Elwood & Whitton (2007).

Elwood & Whitton (2007) han sugerido que probablemente la única forma de determinar si la especie ha invadido recientemente algunos países es a través de estudios moleculares. De ser correcta la hipótesis de que las floraciones masivas se deben a variaciones climáticas, las floraciones observadas en el mundo se originarían por la expansión de poblaciones locales. En contraposición a esto, la hipótesis (ii) implicaría que una o unas pocas variantes se han dispersado por todo el planeta en tiempos recientes. Si esta última hipótesis fuera correcta, la especie debería ser muy homogénea a nivel genético ya que la expansión habría ocurrido en un período de tiempo corto. Por el contrario, si se tratara de la expansión de poblaciones locales, la variación genética debería estar geográficamente estructurada debido al continuo accionar de fuerzas evolutivas como la microadaptación y, especialmente, factores estocásticos actuando en lugares distantes a lo largo de largos períodos de tiempo.

Como fue mencionado anteriormente, la primera detección de *D. geminata* en argentina fue en el año 2010, unos meses después de su reporte en Chile formando una floración (Sastre *et al.*, 2010). Es importante destacar que previo al comienzo del plan de monitoreo de esta especie, hay pocos estudios sobre la flora algal de la Patagonia Argentina. Esta situación, puede haber contribuido a que no se detectara la especie hasta después de 2010, idea reforzada por el hecho de que Asprey y colaboradores (1964) la señalaron como “especie muy rara” en Chile.

El objetivo de este capítulo es evaluar la posibilidad de utilizar tres marcadores genéticos para poder discernir si la especie *D. geminata* ya se encontraba presente en la Argentina antes de 2010. Esto, además, permite evaluar las relaciones filogenéticas entre poblaciones argentinas y con otras pertenecientes a distintas regiones del mundo. En este trabajo se generaron secuencias moleculares de marcador nuclear (gen 18S), uno plastidial (gen *rbcL*) y uno mitocondrial (gen COX-1), todos los cuales han sido previamente utilizados en estudios de diatomeas y otros organismos. El gen 18S es un gen ampliamente utilizado en diatomeas y muchos otros organismos para clarificar la filogenia a nivel de especie o género o reevaluar las relaciones entre clases (Medlin & Kaczmarek, 2004; Cary *et al.*, 2007; Burder & Medlin, 2007; Theriot *et al.*, 2009; Jaramillo *et al.*, 2015). Además, la gran variabilidad contenida en las zonas hipervariables del gen permite también realizar estudios filogeográficos a nivel intraespecífico (e.g. Manrique & Jones, 2017). El gen *rbcL* es muy utilizado debido a que son extremadamente raras las inserciones o deleciones: suele ser más variable que el 18S ADN (Evans *et al.*, 2007). El gen COX-1 ha resultado ser lo suficientemente variable para resolver algunas relaciones taxonómicas y para la identificación de otras diatomeas (Ehara *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2007). Además, estos genes han sido utilizados en trabajos previos sobre *D. geminata* (Cary *et al.*, 2007; Kelly, 2009; Cary *et al.*, 2014; Jaramillo *et al.*, 2015). Para abordar estos objetivos, en primer lugar se realizó la descripción y comparación de la diversidad genética

de las poblaciones de Patagonia argentina y, en segundo lugar, se utilizó un enfoque biogeográfico para inferir si las floraciones recientes de *D. geminata* presentes son producto de una invasión o de expansiones locales de poblaciones ya establecidas.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Muestreo

Entre abril del 2012 y noviembre del 2015 fueron tomadas muestras bentónicas de diferentes localizaciones en las que se observó la presencia de floraciones compatibles con la presencia de *Didymosphenia geminata* (Tabla 7). Las muestras fueron colectadas mediante raspado de sustratos sumergidos colonizados, utilizando un escalpelo descartable abierto al momento de la toma de muestra. El material obtenido fue almacenado en tubos tipo Falcon de 50 ml conteniendo etanol 70% de grado molecular (es decir preparado a partir de agua ultra-pura y alcohol 100% grado molecular). Los tubos fueron sellados mediante un film de parafina (o *Parafilm*) para evitar cualquier posibilidad de evaporación y pérdidas, y mantenidos refrigerados durante su transporte al laboratorio. Todo el muestreo y posterior manipulación fueron realizados de acuerdo a las prácticas de seguridad recomendadas para especies invasoras (Duncan *et al.*, 2007; Casco & Sala, 2011). Una vez en el laboratorio, se corroboró la presencia de material celular compatible con *D. geminata* mediante microscopio óptico (Olympus CKX41) y las muestras fueron mantenidas a -20° C hasta su utilización.

Tabla 7. Sitios de muestreo de poblaciones de *D. geminata* y resultados de la primera ronda de amplificación por PCR de 4 marcadores moleculares.

Sitio	Provincia	Coordenada geográfica	MPI ¹	E_18S ²	U_18S ³	rbcl ⁴	COX ⁵
Río Azul Pasarella (Aza)	RN/CH6	42°02'13.5"S 71°36'12.5°	Si	+	+	+	-
Río Azul Pasarella	RN/CH6	42°02'13.5"S 71°36'12.5°	No	-	-	S/D	-
Río Rivadavia (Ri)	Chubut	42° 37' 3"S 71 43 36.9°	Si	+	+	+	-
Río Quemquemtreu	Neuquén	S/D7	No	-	-	S/D	-
Río Quila-Quina	Neuquén	S/D	No	-	-	S/D	-
Río Grande (GD)	T. del Fuego	43°48'51.60"S 67°55'1.5°	Si	+	+	+	-
Río Futaleufú A (FTa)	Chubut	43°08'13,0"S 71°36'15,9°	No	+	+	S/D	-
Río Futaleufú B (FTb)	Chubut	43°08'13,0"S 71°36'15,9°	Si	+	+	+	-
Río Futaleufú C (FTc)	Chubut	43°10'01,8"S 71°35'18,5°	Si	+	+	+	-
Río Futaleufú D (FTd)	Chubut	43°10'22,9"S 71°35'40.00	Si	+	+	+	-
Río Futaleufú E (FTe)	Chubut	43°10'19,5"S 71°39'02,9°	Si	+	+	+	-
Río Futaleufú F (FTf)	Chubut	43°10'39,6"S 71°37'51,8°	Si	+	+	+	-
Río Chubut (ChR)	Chubut	S/D	Si	+	+	+	-
Río De las Vueltas A	Sta. Cruz	49°06'09,8"S 72°54'18,1"O	Si	-	-	-	-
Río De las Vueltas B	Sta. Cruz	S/D	Si	S/D	S/D	-	-
Río Toro	Sta. Cruz	S/D	No	-	-	-	-

CAPÍTULO IV

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Muestreo

¹ MPI: Aislamiento mediante micropipeteo.

² Gen ribosomal 18S, amplificado mediante primers específicos para *D. geminata* (Cary *et al.*, 2007; Cary *et al.*, 2006).

³ Gen ribosomal 18S, amplificado mediante primers universales (Moon-van der Staay *et al.*, 2001).

⁴ Gen de la subunidad mayor de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa.

⁵ Gen de la subunidad 1 de la Citocromo oxidasa C.

⁶ Límite Río Negro/Chubut.

⁷ Sin datos

4.2.2 Extracción de ADN genómico total a partir de células aisladas

Se aislaron entre 10 y 50 células mediante micropipeteo. El micropipeteo se realizó mediante un dispositivo construido para realizar este trabajo de Tesis (Fig. 28). Este consiste en un semicono de vidrio que en un extremo presenta un calibre de aproximadamente 30 μm , lo cual permite tomar las células en forma individual de manera muy precisa (Fig. 29). El capilar se encuentra ligado a una virola presurizadora, seguida por un tubo flexible el cual es accionado mediante una boquilla. Esto permite al operador mantener libres sus manos para operar el microscopio y dirigir la punta del capilar. Las células aisladas se guardaron en tubos tipo eppendorf y los cuales se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN.

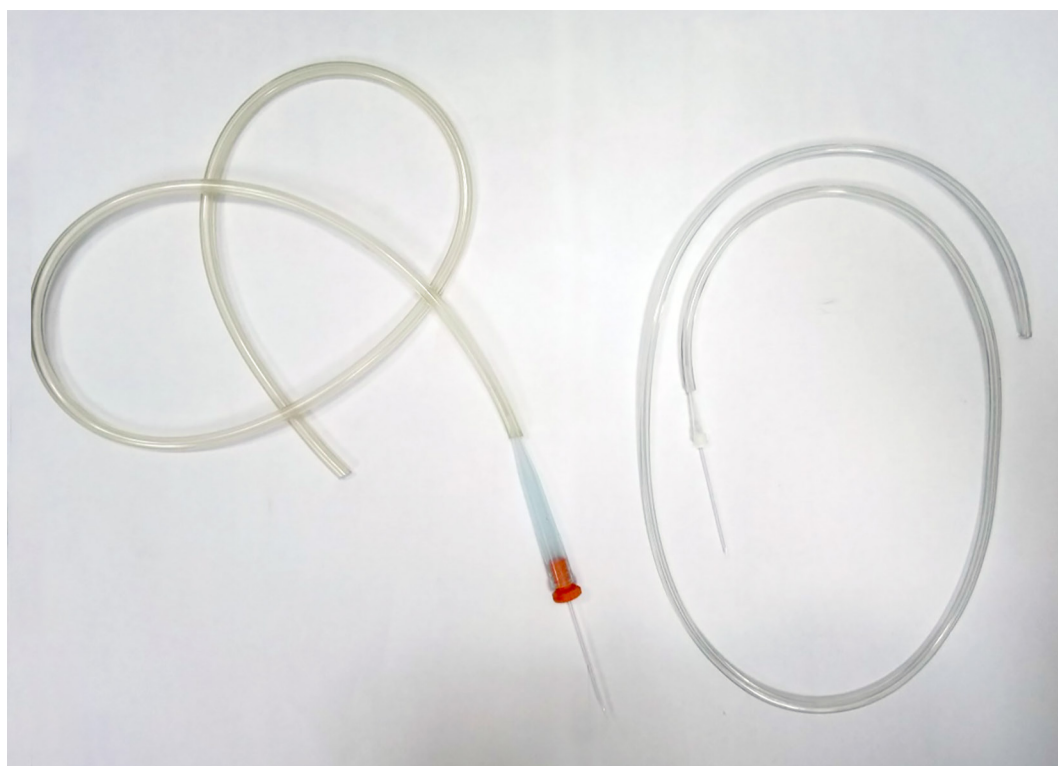


Fig. 28 / Dispositivos para llevar a cabo el aislamiento de las células de *D. geminata*.

CAPÍTULO IV

4.2 Materiales y Métodos

4.2.2 Extracción de ADN genómico total



29.A



29.B

Figura 29 / Células de *D. geminata* aisladas mediante el dispositivo utilizado en esta Tesis. **A:** muestra diluida en agua ultrapura donde se observa una célula de *D. geminata* (flecha) junto a otras células y material indeterminado. **B:** célula aislada de *D. geminata*.

Las extracciones de ADN se realizaron mediante el protocolo optimizado en esta Tesis (Capítulo III). Brevemente, las muestras fueron incubadas a 60 °C durante 1 hora en 700 µL de buffer CTAB (2% CTAB, 1.4 M ClNa, 0.2% β-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% Chelex-100 y 0.3 mg/mL de Proteinase K). Luego de la digestión las muestras fueron tratadas con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) luego de lo cual se digirió el ARN mediante RNasa A (10 µg/mL de concentración final; 1 hora a 37 °C). Luego de precipitar el ADN mediante un volumen de isopropanol (1 h a 4°C) las muestras se centrifugaron a 21.000 G durante 30 minutos a 4°C. Los pellets obtenidos fueron lavados con etanol 70%, secados al aire y resuspendidos en 10 µL de agua libre de DNAsas. Las suspensiones obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8% y espectrofotometría con el objeto de corroborar la cantidad y pureza de las suspensiones. Para la cuantificación de ADN, los geles fueron digitalizados y sometidos a análisis densitométricos contra estándares de 10, 20, 30, 40, 60 y 100 ng de DNA mediante el programa ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). En los casos en los que las preparaciones obtenidas no fueron compatibles con la manipulación debido a la persistencia de contaminantes presentes en las muestras, se llevó a cabo una segunda ronda de purificación mediante el procedimiento descripto.

En el caso de la amplificación de marcadores moleculares a partir de células aisladas se partió de 50 a 60 células. Dado que la matriz correspondiente es diferente a las matas, fue necesario evaluar nuevas condiciones para contar con material adecuado. Para dichos experimentos se utilizó como material de partida una muestra béntica que generó resultados satisfactorios al aplicarse la extracción directa. Se evaluaron dos de los protocolos descriptos en el capítulo III, CTAB y CTABCH, y un protocolo adicional, diseñado en esta Tesis, el cual utiliza el mismo surfactante catiónico y el polímero soluble Polivinilpirrolidona (PVP) el cual

CAPÍTULO IV

4.2 Materiales y Métodos

4.2.2 Extracción de ADN genómico total

además de actuar como quelante permite mejorar las extracciones de muestras que presentan complejos fenólicos. Los 3 protocolos se evaluaron en cuanto a su capacidad de producir extractos que permitan la amplificación parcial del gen 18S rDNA de *D. geminata* utilizando los oligonucleótidos específicos 602F/D1670R (Cary *et al.*, 2007) y las condiciones de amplificación descritas en el Capítulo III. Se observó que la resina Chelex interfiere con la extracción, posiblemente debido a la persistencia de residuos de resina. El protocolo de CTAB-PVP no generó amplificaciones exitosas en ninguna de las condiciones ensayadas. Sin embargo, los extractos obtenidos utilizando el protocolo de CTAB permitieron la amplificación exitosa cuando se utilizaba una alícuota de 1 μ L de extracto (Fig. 30).

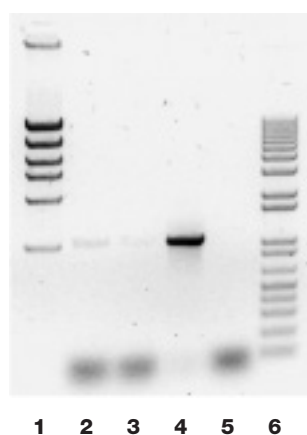


Figura 30 / Amplificación del gen 18S utilizando oligonucleótidos específicos 602F/D1670R para *D. geminata*. La imagen muestra un gel de agarosa 0,8% en buffer TAE teñido con intercalante Red. **Calle 1:** marcador de peso molecular (1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 y 10.000 pares de bases). **Calle 2:** amplicon obtenido con 1 μ L de preparación obtenida a partir de células aisladas del Río Azul; **Calle 3:** amplicón obtenido con 1 μ L de preparación obtenida a partir de células aisladas del Río Rivadavia. **Calle 4:** amplicon obtenido con 0.2 μ L de preparación obtenida a partir de muestra de mata del Río Futaleufú. **Calle 5:** control negativo. **Calle 6:** marcador de peso molecular (100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1.000, 1.650 y 2.000-12.000 pares de bases).

4.2.3 Amplificación y secuenciación de marcadores moleculares

Se amplificaron tres marcadores moleculares que han sido aplicados por otros grupos de investigación al estudio molecular del grupo de diatomeas: el gen 18S ribosomal, la porción media del gen *rbcL*, que codifica para la enzima ribulosa1-5 bifosfato oxigenasa/carboxilasa (RUBISCO o *rbcL*) de cloroplasto y una porción del gen mitocondrial de la enzima ciclo-oxigenasa, COX-1 (Tabla 8) mediante primers previamente publicados (Cary *et al.*, 2006; Moon-van der Staay *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2005). Además de utilizar primers del gen 18S específicos para *D. geminata*, también se utilizaron oligonucleótidos universales como control interno de PCR. Cada una de las PCRs fueron optimizadas mediante reacciones de PCR en gradientes de temperatura (Ishii, 2001). Brevemente, se realizaron reacciones de amplificación en paralelo utilizando el mismo molde y par de oligonucleótidos estudiado, además de las mismas condiciones a excepción de las temperaturas de hibridación, la cuales difirieron entre ellas permitiendo evaluar ocho temperaturas diferentes. Las condiciones de ciclado fueron los siguientes: un ciclo de

desnaturalización de 2 min a 95 °C; 35 ciclos de 95 °C 15 seg., temperatura optimizada durante 15 seg., 72 °C durante 50 seg.; y una etapa de extensión final a 72 °C durante 1 min por cada Kb de amplificación. Los genes COX-1 y *rbcL* se amplificaron mediante una PCR anidada según condiciones previamente publicadas (Guo *et al.*, 2015), ya que algunas muestras resultaron recalcitrantes a la amplificación en una ronda de PCR. Luego de llevar a cabo las reacciones, se analizó el veinte por ciento de las reacciones mediante electroforesis en geles de agarosa 2%.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo los estudios moleculares.

Secuencia 5'-3'	Nombre	Gen
CAC CAG TAA AGG CAT TAG CTG	D1670R	18S ADNr
GTT GGA TTT GTG ATG GAA TTT GAA	D602F	18S ADNr
ACCTGGTTGATCCTGCCAG	EuK18SF	18S ADNr
TGATCCTTCYGC AGGTTAC	EuK18SR	18S ADNr
CAA CCA YAA AGA TAT WGG TAC	GazF2	Cox1
GGA TGA CCA AAR AAC CAA AA	GazR2	Cox1
AAG GAG AAA THA ATG TCT	DPrbcL1	<i>rbcL</i>
AA RCA ACC TTG TGT AAG TCTC	DPrbcL7	<i>rbcL</i>

Una vez analizados, y habiendo determinado que los fragmentos obtenidos poseían el tamaño esperado, los mismos fueron purificados y cuantificados por densitometría mediante comparación con marcadores de masa según se describe en secciones anteriores. Las secuencias se generaron mediante métodos estándar, como se describe a continuación. Como primer paso se amplificaron los marcadores mediante PCR siguiendo las condiciones ya descriptas. Luego de verificar la reacción mediante electroforesis analítica, los productos obtenidos fueron sometidos a una electroforesis preparativa, y los ADN fueron purificados a partir del gel mediante la técnica *Freeze-Squeeze* (Tautz & Renz, 1983). Los productos purificados fueron cuantificados fluorométricamente utilizando el software Image-J (Abramoff *et al.*, 2004) y patrones de masa de entre 10 y 200 ng (Invitrogen, High Mass DNA ladder y Low Mass DNA ladder). La secuenciación fue realizada a partir de 10 ng cada 100 bases de amplicón en una solución de 20 ng/μL, mediante los primers específicos arriba descriptos. Las reacciones de secuenciación propiamente dichas y secuenciación automática fueron realizadas mediante el servicio de secuenciación Sanger de MacroGen. Los cromatogramas fueron analizados mediante el programa BioEdit (Hall,

1999) con el objeto de verificar la calidad de las mismas y eliminar las regiones donde no se obtuvo una señal adecuada (por ejemplo fondo, picos anómalos, etc.). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos pública GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) bajo los números de acceso KY007192-KY007220.

4.2.4 Análisis de secuencias

Previo a los análisis evolutivos, las secuencias fueron alineadas mediante el programa MAFFT utilizando el método iterativo (Kato *et al.*, 2002). Los análisis filogenéticos fueron realizados mediante el programa PhyML bajo modelos evolutivos inferidos mediante MrAIC (Nylander, 2004), lo cual indicó que el modelo que mejor explicó la diversidad para todos los marcadores fue un modelo JC69 con tasas constantes entre posiciones y sin posiciones invariantes. Las búsquedas se realizaron mediante el programa PhyML (Guindon *et al.*, 2010). Estas consistieron en 10 secuencias de adición al azar seguidas de reordenamientos mediante intercambio de vecinos más cercanos (NNI) y poda y reinserción de sub-árboles (SPR). El soporte de ramas fue calculado mediante bootstrap, el cual se realizó a partir de 100 matrices remuestreadas bajo el mismo esquema de búsqueda. Las comparaciones con bases de datos para la inclusión de grupos externos fueron realizadas mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

4.3 Resultados

De las muestras bentónicas colectadas entre abril de 2012 y noviembre de 2015 en varias locaciones de Patagonia Sur, diez fueron confirmados como positivos para PCRs específicas para el gen 18S de *D. geminata* (Tabla 7). Las mismas fueron seleccionadas para amplificar el resto de los marcadores.

A pesar de que se pudieron amplificar los marcadores en varias de las muestras, algunos genes no pudieron amplificarse mediante una única ronda de PCR en algunas muestras, incluso luego de la obtención de células aisladas (Tabla 7). Asimismo, un análisis mediante PCR en gradiente sugirió que existen algunos problemas con los primers disponibles, como formación de dímeros, amplificación de bandas inespecíficas y la necesidad de utilizar temperaturas de annealing relativamente bajas (Fig. 31). Con fines comparativos, la Figura 31 muestra un análisis mediante PCR en gradiente de los primers universales F27 y R1492 para el gen 16S a partir de ADN metagenómico utilizado como molde. En dicha figura, puede observarse la presencia de un fragmento de amplificación a lo largo de todas las temperaturas, a diferen-

cia de lo que se observa en los demás experimentos realizados utilizando como molde ADN total obtenido a partir de muestras bentónicas. Puede observarse también, que utilizando una temperatura de 53,8 °C pueden obtenerse productos sin bandas inespecíficas, con muy poca cantidad de dímeros y buenas cantidades de ADN. En contraposición, las amplificaciones del gen 18S de *D. geminata* presentaron cantidades substanciales de dímeros así como bandas inespecíficas y/o poca cantidad de ADN específico. Tanto COX-1 como *rbcL* requirieron de temperaturas de annealing muy bajas para producir cantidades aceptables de ADN (COX-1) o evitar la aparición de bandas inespecíficas. Además, la PCR de COX-1 produjo muy poca cantidad de ADN, lo cual puede explicar los resultados negativos al momento de amplificar algunas de las muestras de campo evaluadas en esta Tesis (Tabla 7) y problemas similares observados por otros grupos de investigación (Jaramillo *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2017).

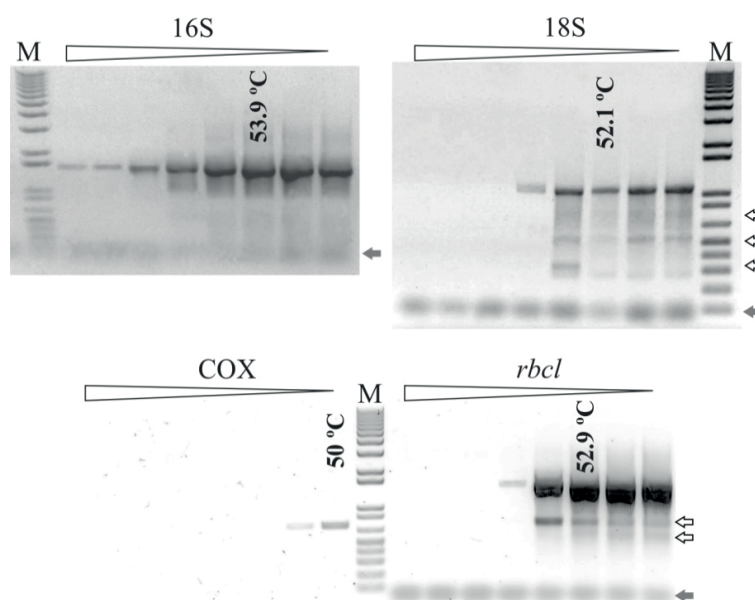


Figura 31 / Desempeño de diferentes ensayos de amplificación mediante la primera ronda de PCR en gradiente. Cada panel se encuentra individualizado por el nombre del gen amplificado (16S, 18S, la COX-1 y *rbcL*). Los análisis de 16S se realizaron utilizando como molde ADN metagenómico y los oligonucleótidos F27 y R1492 tal como se describe en Manrique y colaboradores (2012). M: marcador de peso molecular (100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1.000, 1.650 y 2.000-12.000 pares de bases). Las flechas abiertas indican la posición de bandas inespecíficas. Las flechas grises cerradas indican la posición de dímeros de cebadores. Los triángulos sobre la imagen de los gels indican la dirección del gradiente desde las temperaturas más altas (izquierda) a las más bajas (derecha). Las temperaturas que funcionaron mejor se indican en las líneas de gel correspondientes.

Teniendo en cuenta la baja tasa de reacciones positivas observada, los genes *rbcL* y COX-1 fueron amplificados mediante PCRs anidadas. Esta técnica presenta una mayor

sensibilidad respecto a la amplificación en un único round de PCR, lo cual permite en muchos casos obtener productos de amplificación de muestras problemáticas. En total se generaron 10 secuencias del gen 18S (muestras AZa, ChR, FTa, FTb, FTc, FTd, FTe, FTf, GD y RI), 10 del gen COX-1 (muestras AZa, ChR, FTa, FTb, FTc, FTd, FTe, FTf, GD y RI) y 9 del gen *rbcl* (muestras AZa, ChR, FTb, FTc, FTd, FTe, FTf, GD y RI) (ver Tabla 7 para identificación de secuencias). Para el caso del gen COX-1 se determinaron entre 387 y 402 posiciones (media 389.8), mientras que para *rbcl* se generaron entre 605 y 629 posiciones (media 625.6) y para 18S entre 937 y 1031 posiciones (media 984.9).

Las secuencias del gen COX-1 no presentaron variabilidad entre las muestras argentinas, debido a lo cual no brindaron información relevante en relación a los objetivos de esta Tesis. No obstante, la generación de estas secuencias es importante porque este marcador es muy utilizado en la generación de códigos de barra genéticos. Estas secuencias son las primeras en generarse para *D. geminata* en todo el mundo. Si bien este marcador ha sido utilizado con éxito en muchas especies, en todos los casos debe ser evaluado con respecto a la diferenciación del mismo con respecto a otros taxa. Por lo tanto, las secuencias de *D. geminata* se combinaron con todas las secuencias de diatomeas disponibles en GenBank y los datos obtenidos se analizaron mediante análisis filogenético con el fin de evaluar el potencial del gen en dicho tipo de análisis. Una vez alineadas la matriz presentó 1091 sitios de los cuales 390 fueron informativos. El análisis filogenético mostró que las secuencias de *D. geminata* se agruparon en un clado fuertemente soportado (Fig. 32). El árbol obtenido refleja que existe una diferenciación sustancial entre las secuencias de *D. geminata* y del resto de las secuencias de diatomeas disponibles en GenBank, lo cual se refleja en el largo de la rama basal del clado. Por otro lado, es interesante destacar que la ubicación del clado en una posición mas derivada que los clados formados por diatomeas marinas y céntricas condice con estudios realizados sobre la evolución de diatomeas donde los mayores eventos evolutivos muestran que la aparición de las diatomeas “pennadas” fue posterior a la de las diatomeas “céntricas” (Sims *et al.*, 2006; Medlin *et al.*, 2016). Asimismo, las relaciones reflejadas en el árbol se condicen con el sistema clasificatorio de Round y colaboradores (1990) y, en aquellos casos en los que existen secuencias para más de una especie por género, se recuperaron como monofiléticos a los géneros *Sellaphora*, *Gomphonema*, *Asterionellopsis* y *Haslea*. Todos estos resultados sugieren un gran potencial del gen COX-1 en la generación de códigos de barra para *D. geminata*, lo cual deberá reevaluarse cuando se cuente con secuencias de especies más relacionadas como *Cymbella*, *Gomphoneis*, *Gomphocymbella* y *Encyonema* (Round *et al.*, 1990; Kamarrec *et al.*, 2011; Kocielek *et al.*, 2015).

4.3 Resultados



Pág. 115

En cuanto al gen 18S, presentó también una variabilidad reducida (Tabla 9).

Tabla 9. Variabilidad¹ de las secuencias del gen 18S entre las muestras argentinas de *D. geminata*.

	FTa	FTb	FTc	FTd	FTe	FTf	RI	ChR	GD ¹¹
AZ ²	1	2	1	0	0	0	1	0	0
FTa ³		2	1	0	0	0	0	1	0
FTb ⁴			0	2	2	2	2	2	2
FTc ⁵				1	1	1	1	1	1
FTd ⁶					0	0	1	1	0
FTe ⁷						0	0	0	0
FTf ⁸							1	1	0
RI ⁹								2	2
ChR ¹⁰									2

¹ Número de posiciones con sustituciones o *indels*

² Río Azul

³ Río Futaleufú A

⁴ Río Futaleufú B

⁵ Río Futaleufú C

⁶ Río Futaleufú D

⁷ Río Futaleufú E

⁸ Río Futaleufú F

⁹ Río Rivadavia

¹⁰ Río Chubut

¹¹ Río Grande.

Las secuencias argentinas fueron comparadas con secuencias de *D. geminata* de Chile y de otras regiones del mundo. Comparaciones realizadas con la base de datos GenBank mediante el programa BLAST indicaron que las secuencias más próximas a las secuencias del gen 18S de argentina corresponden a secuencias de especies del género *Cymbella*, las cuales fueron incluidas como grupo externo (Fig. 33). Luego del alineamiento se obtuvo una matriz que presentó 2026 posiciones, de las cuales 57 fueron filogenéticamente informativas. En concordancia con la observación directa de las secuencias argentinas (Tabla 9), el análisis filogenético mostró una diversidad limitada pero informativa con respecto a las hipótesis planteadas en este trabajo (Fig. 33). En primer lugar, se observa un politomía de grado 6 para el género. En particular, cuatro secuencias chilenas (DCA, DRA, DLO y DTU) se ubicaron por fuera del clado conteniendo al resto de las secuencias de *D. geminata*, sugiriendo la existencia de linajes diferentes circulando en la región lo cual a su vez apoya la idea de que la especie ha estado presente en el sur de Sudamérica previo a las primeras floraciones detectadas en 2010. Si bien los valores de soporte de ramas son bajos, lo cual hace que esta observación deba considerarse como tentativa, el análisis del gen *rbcL* también indica que las secuencias DCA y DLO pertenecerían a linajes con una historia diferente al resto de las muestras estudiadas, como se detalla más abajo. Por otro lado, las secuencias argentinas son recuperadas en un grupo que tiene como clado hermano a

una secuencia chilena por lo que podría estar indicando a Chile como fuente de invasión. Dentro del grupo de las secuencias argentinas, se observa que la secuencia proveniente de una de las muestras del Río Futaleufú (primer río donde fue detectada *Didymosphenia geminata* en Argentina), se encuentra formando un clado con la secuencia proveniente de Estados Unidos. Esto podría sugerir también una invasión por parte de especímenes provenientes de ese país.

Por otro lado, la secuencia proveniente de la muestra de Río Grande, Tierra del Fuego, se agrupa en un clado formado por secuencias del Río Futaleufú de la provincia del Chubut, por lo que soporta lo observado por los análisis morfológicos de que pertenecen a la misma especie. Dentro de este clado, también fue recuperada una de las secuencias chilenas, sugiriendo que hay un linaje circulando entre los dos países.

Como fue mencionado anteriormente, todas estas hipótesis deben tomarse como tentativas ya que los soportes de rama son bajos.

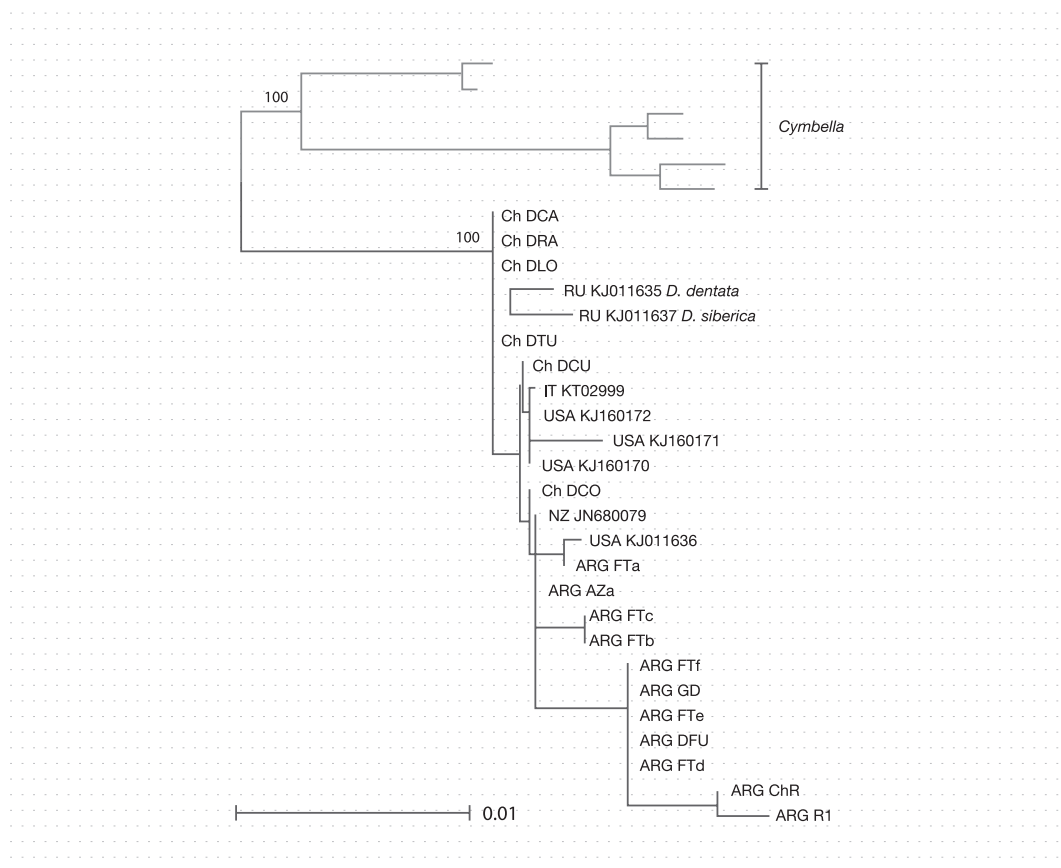


Figura 33. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de las secuencias del gen 18S. RU Rusia; CH Chile, ARG Argentina, USA Estados Unidos, IT Italia. Las secuencias de CH fueron gentilmente cedidas por la Dra. Leyla Cardenas de la Universidad Austral de Chile. Las secuencias de USA y RU fueron tomadas de GenBank. Se utilizaron secuencias de miembros de *Cymbella* para enraizar el árbol, las cuales fueron tomadas de GenBank. También se incluyen secuencias de *D. dentata* y *D. siberica*. Los números sobre o cerca de las ramas corresponden a soportes de bootstrap (N = 100). Sólo se muestran soportes superiores a 50. Las unidades de la escala son sustituciones por posición alineada.

Las secuencias del gen *rbcL* presentaron también una variabilidad baja (Tabla 10), mostrando una politomía de grado 14. No obstante, se observaron patrones filogenéticos relevantes, principalmente al comparar las posiciones topológicas de algunas muestras de Chile y Argentina. Como grupo externo se utilizaron secuencias de *D. siberica*, *D. dentata* y varias especies de *Cymbella*, siendo este género el más cercano a *Didymosphenia* según comparaciones realizadas con todas las secuencias de Bacillariophyceae disponibles en la base de datos pública *GenBank*, en concordancia con lo observado en trabajos recientes (Jaramillo *et al.*, 2015). Una vez alineado, el dataset presentó 1475 posiciones de las cuales 63 fueron informativas. Si bien el análisis filogenético soportó la monofilia de *Didymosphenia* con un buen soporte, el árbol presentó dos secuencias del grupo externo (*D. siberica* y *D. dentata*) intercaladas dentro del grupo interno (Fig. 34), encontrándose como clado hermano del resto de las especies del género *Didymosphenia*, dos secuencias chilenas (*DLORU* y *DCARU*) pertenecientes a la especie *D. geminata*. Las secuencias argentinas se combinaron con secuencias de Chile y Estados Unidos. El clado que se encuentra como hermano del grupo del que forman parte las secuencias argentinas, está formado por una secuencia proveniente de Chile, por lo que podría interpretarse como una invasión proveniente de ese país. Además, dentro de ese grupo, hay una clado formado por una secuencia chilena (*DTURU*) y una argentina (*FTe*), lo que estaría indicando una circulación en la región patagónica chileno-argentina. Al igual que en el caso del gen *rbcL*, todas estas hipótesis son tentativas dado que el soporte de de las ramas es bajo.

Tabla 10. Distancias genéticas⁽¹⁾ entre las secuencias del gen *rbcL* de *D. geminata* estudiadas en esta Tesis.

	<i>FTb</i>	<i>FTc</i>	<i>FTd</i>	<i>FTe</i>	<i>FTf</i>	<i>ChR</i>	<i>RI</i>	<i>ChR</i>	<i>GD</i> ¹⁰
<i>Aza</i> ²	1	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>FTb</i> ³		1	1	2	1	1	1	1	2
<i>FTc</i> ⁴			0	1	0	0	0	2	1
<i>FTd</i> ⁵				1	0	0	0	1	1
<i>FTe</i> ⁶					1	1	1	1	2
<i>FTf</i> ⁷						0	0	0	1
<i>ChR</i> ⁸							0	1	1
<i>RI</i> ⁹								2	1

¹Número de posiciones con sustituciones o *indels*

²Río Azul

³Río Futaleufú B

⁴Río Futaleufú C

⁵Río Futaleufú D

⁶Río Futaleufú E

⁷Río Futaleufú F

⁸Río Chubut

⁹Río Rivadavia

¹⁰Río Grande

CAPÍTULO IV

4.3 Resultados



Figura 34. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de la secuencias del gen *rbcL*. RU Rusia (*D. dentata* y *D. siberica*); CH Chile, ARG Argentina, USA Estados Unidos. Las secuencias de CH y USA fueron tomadas de GenBank. Se utilizaron secuencias de miembros de *Cymbella* para enraizar el árbol, las cuales fueron tomadas de GenBank. También se incluyen secuencias de *D. dentata* y *D. siberica* tomadas de GenBank. Los números sobre o cerca de las ramas corresponden a soportes de bootstrap (N = 100). Sólo se muestran soportes superiores a 50. Las unidades de la escala son sustituciones por posición alineada.

4.4 Discusión

Los primeros resultados descriptos anteriormente indican que, además de la recalcitrancia de las muestras bénticas (Capítulo III), existen otros factores que dificultan el estudio molecular de la especie, incluyendo posiblemente variabilidad inter-muestra y baja performance de los primers disponibles. La baja performance de los primers puede deberse a la existencia de variabilidad genética entre las muestras y/o a problemas relacionados con cuestiones termodinámicas, los cuales se encuentran por fuera de los objetivos de esta Tesis. Cabe destacar que esta recalcitrancia de las muestras ambientales ha sido observada en forma independiente y reciente por Jaramillo y colaboradores (2015), quienes en concordancia con esta

Tesis, destacan que la complejidad intrínseca de las muestras ambientales actúa como una fuente de interferencia significativa al momento de realizar estudios moleculares. Esto, por otro lado, resalta también la importancia de los estudios descriptos en el capítulo III de esta Tesis. El hecho de que en los experimentos aquí descriptos las amplificaciones hayan sido negativas, incluso luego de aislar las células del sustrato, sugiere que las células de *D. geminata* podrían presentar inhibidores adheridos o bien en su interior. De hecho, en comparación con otras algas y a pesar de la gravedad de los problemas ocasionados por *D. geminata*, existe una escasa cantidad de estudios de su ecología molecular. Estos se han visto dificultados debido en parte a la demostrada recalcitrancia de la especie a la generación de secuencias. Sumado a esto, las aplicaciones para las cuales la eficiencia de la PCR es crítica, como la detección y cuantificación mediante PCR cuantitativa (por ejemplo real time PCR), la presencia de inhibidores y otros problemas en las reacciones puede ser extremadamente perjudicial ya que puede conducir a falsos negativos y errores de varios órdenes de magnitud en la cuantificación a partir de muestras ambientales (Bar *et al.*, 2012; Rutledge & Stewart, 2008). De esta forma, *D. geminata* constituye un caso paradigmático sobre la importancia de contar con protocolos optimizados para ser utilizados en aplicaciones ambientales (Green & Field, 2012; Pontiroli *et al.*, 2011).

Hasta el momento no se habían reportado secuencias del gen COX-1 para *D. geminata*, lo cual es relevante ya que el mismo es uno de los marcadores más utilizados en código de barras de ADN. Vale decir que los datos generados en este trabajo podrían tener un impacto importante en lo referente a identificación y detección molecular mediante técnicas de código de barras de ADN. Si bien este marcador ha sido utilizado con éxito en muchas especies, en todos los casos debe ser evaluado con respecto a la diferenciación del mismo con respecto a otros taxa.

El gen 18S presentó una variabilidad reducida. No obstante, y teniendo en cuenta que se trata de un gen muy conservado, los datos aportan soporte para las dos hipótesis planteadas en este trabajo. Por un lado, demuestran la circulación de diferentes variantes del gen en la región (Tablas 9; Fig. 33), y que secuencias chilenas de la especie se encuentran por fuera del clado que agrupa a al resto de las secuencias de *D. geminata*. Esto apoyaría la idea de que la especie ha estado presente durante un periodo de tiempo sustancial en América del Sur, en contraposición a la idea de que se trataría de una especie invasora introducida recientemente, caso en el cual sería más plausible que se observe una homogeneidad más marcada entre las secuencias. Además, hay que tener en cuenta que estudios realizados en Chile indican que en la década del 60' el alga ya estaba presente en la región aunque en muy baja frecuencia (Asprey *et al.*, 1964). Sin embargo, el hecho de que secuencias chilenas se encuentren por fuera del clado que agrupa al resto de los especímenes de *D. geminata*, puede sugerir una invasión por parte de un linaje chileno. Además, el hecho de que una de las secuencias argentinas se agrupe con una nortea-

americana, puede sugerir también la posibilidad de que al menos hubo una invasión por parte de un linaje norteamericano (sumado a que la secuencia argentina proviene de una muestra tomada en Río Futaleufú, primer río donde se hallaron floraciones de la especie en el país).

Es interesante señalar que en la filogenia del gen *rbcL*, las secuencias que quedan por fuera de *D. geminata* (DLO y DCA) corresponden a dos de las 3 secuencias que presentaron un comportamiento similar en la filogenia del gen 18S (Fig. 33). Jaramillo y colaboradores (2015) obtuvieron resultados similares a los aquí descritos respecto a las muestras DCA y DCL (Jaramillo *et al.*, 2015), tanto en sus análisis filogenéticos como en comparaciones realizadas contra la base de datos pública *GenBank*. Este comportamiento particular fue atribuido a (i) herencia plastidial, (ii) inconsistencia de las bases de datos y (iii) polimorfismo. Si bien no existe comprobación experimental acerca de estas tres hipótesis, el hecho de que estas secuencias se encuentren por fuera del clado que agrupa a las secuencias restantes de *D. geminata* y a secuencias de las especies de *D. siberica* y *D. dentata*, es llamativo. Es importante destacar que estas dos últimas especies son muy diferentes morfológica y morfométricamente a *D. geminata* y que son endémicas del Lago Baikal (Rusia). El Lago Baikal, es un lago que se caracteriza por la gran cantidad de especies endémicas de diatomeas. Por otro lado, el flujo turístico entre ambas regiones podría ser considerado raro a diferencia de lo que sucede con pescadores deportivos de USA, Europa y Nueva Zelanda. Estos hechos, podrían soportar la hipótesis de una inconsistencia de los datos, aunque, como fue mencionado anteriormente, es necesaria una comprobación experimental.

En caso de que la hipótesis (ii) no sea la correcta, la gran divergencia observada en DCA y DCL sugeriría fuertemente la existencia de una estructuración geográfica que falsearía la hipótesis de la dispersión antropogénica como causa de las recientes floraciones masivas. Vale decir que la diversidad genética observada sería poco plausible si se tratara de un linaje recientemente introducido en un evento de tipo fundador, los cuales producen cuellos de botella asociados con una fuerte pérdida de variabilidad genética. Sin embargo, si la hipótesis (ii) fuese la correcta, se observaron otras evidencias que pueden sugerir que las floraciones masivas se deben a la expansión de variantes locales y no a la dispersión global de una nueva variante genética. En particular, la secuencia correspondiente a la muestra *FTe* se separó del resto de las secuencias de Argentina y asimismo se observó divergencia para el caso de las secuencias chilenas *DTU* y *DCU*. El hecho de que *FTe* haya sido obtenida del mismo curso que *FTa-d* y *FTf* (todas obtenidas en la misma fecha que *FTe*; 2012), junto con el hecho de que *FTe* se encuentra topológicamente cerca a la secuencia chilena *DTU* correspondiente a una muestra de 2014, sugiere la circulación dinámica de diferentes variantes de la especie a nivel regional, en contraposición a la idea de que la especie es “nueva” en América del Sur y producto de una invasión reciente, caso en el cual se observaría una homogeneidad genética

o bien una asociación en el árbol concordante con la fecha de identificación, producto de una colonización seguida de diversificación. Como se detalla en secciones previas, hay que tener presente que si bien se ha dado difusión a la idea de la “invasión” de *D. geminata*, existen reportes de la especie en la región que se remontan a la década del 60’ (Asprey *et al.*, 1964). Estos autores observaron la presencia de *D. geminata* en muy bajas frecuencias, y de hecho la incluyeron entre las “especies raras”, lo cual podría explicar por qué no fue detectada en nuestro país hasta tiempos recientes en los que la diatomea comenzó a producir crecimientos masivos. Además, esta hipótesis es consistente con varios estudios realizados desde 2007 (ver Introducción) los cuales han demostrado la importancia del P en el desarrollo de las floraciones masivas, sugiriendo que las mismas podrían deberse a cambios climáticos y no al comportamiento invasivo de una nueva variante genética dispersada por el hombre. Asimismo, si bien Beamud y colaboradores (2016) coinciden con Ellwood & Whitton (2007) en la importancia de la disponibilidad de P en las floraciones de *D. geminata*, ellos plantean que el hecho de que las floraciones de *D. geminata* en Patagonia ocurran en sitios no ideales ($P > 4 \mu\text{g/l}$, cuando Bothwell y colaboradores (2014) proponen valores de $P < 2 \mu\text{g/l}$) pero con un claro potencial de presión de introducción, consideran que presenta un claro apoyo a la hipótesis de que *D. geminata* es invasiva. Sin embargo, la politomía observada de un grupo de secuencias argentinas (*GD*, *FTb*, *FTc*, *FTf*, *ChR*, *RI* y *Aza*) con secuencias chilenas (*DFURU*, *DCORU*, *DRARU*) y de Estados Unidos (*BCC01*, *CH054*) obtenida a partir del análisis del gen *rbcL*, podrían sugerir cierta homogeneidad que pudo ser interpretada como la colonización por parte de un linaje transportado a través de diferentes regiones el mundo. Como fue mencionado en el capítulo II, Stoermer y colaboradores (1986), plantearon que *Didymosphenia geminata*, tal como estaba delimitada, comprendía varios morfotipos diferenciados geográficamente. Dentro de una posible hipótesis, ellos señalan que la especie *D. geminata* presente en diferentes regiones del mundo, derivaron de un linaje proveniente del Lago Baikal, que fue dispersado en el mundo. Si bien ellos no plantean el momento en que esto habría ocurrido, se puede pensar que ocurrió hace suficiente tiempo atrás, lo que permitió que la especie gane variabilidad genética, y se adapte a los nuevos nichos colonizados. Además, esto también podría explicar la cercanía genética de las especies *D. geminata*, *D. siberica* y *D. dentata*.

4.5 Conclusión

Tal como se observó en trabajos recientes de otros grupos de investigación, los marcadores genéticos comunmente utilizados en otras diatomeas y otros grupos biológicos presentaron una diversidad relativamente baja en las muestras argentinas. No obstante, la variabili-

dad observada para nuestra región fue similar a la observada globalmente. Esto indica que, si las floraciones recientes se deben a una invasión, existe un mecanismo dispersivo que genera una gran presión de propágulos de forma tal que en muy poco tiempo (~10-15 años) se ha podido establecer una diversidad similar a la observada en todo el planeta. Otra posibilidad, consistente con la segunda hipótesis analizada en este trabajo, es que *D. geminata* haya estado circulando durante mucho tiempo en la región, pudiendo alcanzar a lo largo de dicho lapso niveles de diversidad equivalentes a la diversidad global del alga, mediante diversificación regional o dispersión natural a largo plazo.

En síntesis, si bien los resultados de este estudio no contradicen la hipótesis de que en la Patagonia argentina las floraciones de *D. geminata* responderían a expansiones de cepas locales de la especie, tampoco permiten descartar por completo la hipótesis de que las floraciones son producto de una o más introducciones favorecidas por la capacidad de la especie de permanecer viable fuera del agua por largos periodos de tiempo y utilizar al hombre como vector de dispersión.

CAPÍTULO V

Distribución de *Didymosphenia
geminata* en la provincia
del Chubut.

DISTRIBUCIÓN DE *DIDYMOSPHENIA GEMINATA* EN LA PROVINCIA DEL CHUBUT.

5.1 Introducción

Como se mencionó en capítulos anteriores, *Didymosphenia geminata* fue señalada históricamente como una especie de distribución circumboreal presente en Europa, Asia y América del Norte y, característica de aguas oligotróficas y frías (Blanco & Ector, 2009; Whitton *et al.*, 2009). Los registros más antiguos de floraciones masivas tienen más de 100 años en ríos de Escandinavia (Lindstrom & Skulberg, 2008) mientras que los registros más antiguos de floraciones en los EE.UU son de hace 20 años (Bothwell & Spaulding, 2008). A partir de entonces, se ha documentado en forma creciente la presencia de grandes floraciones en el Hemisferio Norte, registrándose eventos en Canadá, Estados Unidos, Islandia, Polonia, Italia y España (Bothwell *et al.*, 2014; Gillis & Chalifour, 2010; Taylor & Bothwell, 2014). Sin embargo, éstos no fueron descritos como invasiones debido a que *Didymosphenia geminata* ya estaba presente en esos ambientes (Kilroy & Unwin, 2011). En la última década ha sido reportada como una especie invasora agresiva en ríos oligotróficos de todo el mundo (Spaulding & Elwell, 2007; Blanco & Ector, 2009; Kilroy & Unwin, 2011). En el Hemisferio Sur, las primeras grandes proliferaciones se registraron en Nueva Zelanda a partir del año 2004 (Kilroy, 2004) y numerosos estudios han inferido que su introducción en estas nuevas áreas fue debida a la intervención humana, principalmente relacionada a la pesca deportiva de salmónidos (Kilroy, 2008; Kilroy *et al.*, 2007).

Basándose en modelos de nicho ecológico, en 2006 McNyset y Julius (en Spaulding and Elwell, 2007) realizaron un mapa global con sitios con alta probabilidad de ser invadidos por la especie. En el mencionado mapa los ríos del Hemisferio Sur, y en especial la zona patagónica de Argentina y Chile, se muestran como sitios con alto riesgo de nuevas introducciones e invasiones. Frente a esta alerta, se realizaron muestreos prospectivos en las zonas de riesgo y en 2010, la especie fue hallada en Río Futaleufú de cuenca compartida entre Chile (Reid *et al.*, 2012) y Argentina (Sastre *et al.*, 2013). En solo un año se confirmó su presencia en 20 ríos distribuidos a lo largo de 800 km en Chile (Reid *et al.*, 2012). En Argentina, luego de su hallazgo en la provincia del Chubut (Sastre, 2010), fue hallada en Neuquén (Moreno *et al.*, 2011), Río Negro (Beamud *et al.*, 2013) y Tierra del Fuego (Sala *et al.*, 2013).

Si bien la pautas de manejo de la especie están focalizadas en las actividades an-

trópicas como turismo y pesca, recientemente se ha mencionado como posible causa de la formación de estas proliferaciones masivas, la influencia a gran escala de la intervención humana en los procesos climáticos, atmosféricos y edáficos (Bothwell *et al.*, 2014). Además, recientemente se ha demostrado en Chile, que la fauna asociada a los cuerpos de agua puede actuar también como agente de dispersión a nivel local (Bus Leone *et al.*, 2014).

Los efectos adversos que causa en los ecosistemas fueron bien documentados (James & Chipps, 2016; Kilroy & Dale, 2006; Kilroy, 2005; Kilroy *et al.*, 2005; Larned *et al.*, 2006; Sanmiguel *et al.*, 2016; Whitton *et al.*, 2009) por lo que su aparición en los ríos patagónicos puso en alerta a la comunidad científica y a los organismos de gestión.

Contrariamente a lo que se pensaba hasta hace poco tiempo en relación a su distribución exclusiva en el Hemisferio Norte (Spaulding & Elwell, 2007), la especie estaba presente en América del Sur, específicamente en Chile, al menos desde la década del 60' (Asprey *et al.*, 1964; Rivera & Gebauer, 1989). Sin embargo, de acuerdo a lo documentado en Vouilloud (2003) y publicaciones posteriores, en Argentina la especie no fue reportada hasta 2010. Considerando que la información básica en Argentina es escasa en relación a la extensión y variabilidad geográfica del territorio, es posible que al igual que en Chile, esta especie haya estado presente en pequeñas poblaciones. Independientemente de si se trata de una especie nativa o exótica, *Didymosphenia* está colonizando rápidamente nuevas áreas en la Patagonia.

En las últimas décadas, se han incorporado nuevas herramientas tecnológicas de análisis para la resolución de problemas ambientales similares a los ocasionados por *D. geminata*. La necesidad de ampliar y aplicar el conocimiento científico disponible así como de integrar el conocimiento proveniente de otras disciplinas, hizo indispensable recurrir a modalidades de análisis que permitan el manejo de información con base territorial (Moreira-Muñoz, 1996). Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) constituyen una herramienta que permite manejar información muy variada y compleja, proveniente de fuentes diversas, facilitando el análisis simultáneo de varias dimensiones de un mismo problema (Burrough, 1986). Desde su aparición a fines de los '80, han sido de suma utilidad en estudios sobre conservación de la biodiversidad, análisis de especies como indicadores ambientales, estudios de impacto ambiental y de la distribución de especies (Fitzhugh, 2005; Giansante & Pelini, 2007; Haslett, 1990; Hijmans *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1997; Ramachandra & Ahalya, 2001; Salem, 2003; Shultz, 2000), entre otros. En cuanto a estudios específicos relacionados a distribución de diatomeas, pueden citarse trabajos relacionados a índices de calidad de agua (Behrendt & Opitz, 2001; Naumoski *et al.*, 2011), distribución de especies (Cai *et al.*, 2005; Potapova and Charles, 2002) y estudios sobre especies invasoras (Blanco & Ector, 2009; Kumar *et al.*, 2009). En este contexto se desarrolló un estudio cuyo objetivo fue relevar el estado de situación de *Didymosphenia* en Argentina hasta la fecha (Uyua *et al.* 2016a). Hasta 2015, *D. geminata* se encontraba produciendo

floraciones no solo a lo largo del área andina de la Patagonia argentina, sino también, en la región estepa patagónica (Fig. 35). En la provincia de Santa Cruz se observa que la distribución de la especie está restringida a una pequeña área, que seguramente está vinculada a la falta de monitoreos en dicha provincia. Por el contrario, la distribución restringida en la provincia de Tierra el Fuego estaría vinculada a otros factores ya que se cuenta con muestreos más amplios que han dado resultados negativos (Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente, 2014). Asimismo, en esta provincia se tomaron medidas de prevención como la prohibición de pescar dentro de los límites del Parque Nacional.



El uso de herramientas SIG permite no solo ordenar y visualizar los datos recopilados sino que constituye una base de datos geográfica de valor para continuar el análisis de la distribución de la especie en las áreas de interés así como sus posibilidades de expansión.

El objetivo de este capítulo fue analizar la dinámica de la invasión de *Didymosphenia* en la provincia del Chubut. Para alcanzar este objetivo, se generó una base de datos a partir de información obtenida en este estudio, por grupos de trabajo de la Universidad de La Plata, por organismos gubernamentales e información disponible en la WEB.

Este primer paso permitirá a posteriori incorporar más información, como datos ambientales y probabilísticos, que van a permitir evaluar cuales son los sitios susceptibles de ser colonizados por la especie. La base de datos en si misma es una herramienta disponible para la toma de decisiones sobre el manejo de los recursos acuáticos invadidos y no invadidos por *D. geminata* en la provincia. Además, esta herramienta permitirá una mejor comprensión de las características de los nichos ocupados por el alga.

5.2 Materiales y Métodos

Las muestras provenientes de la provincia del Chubut, fueron colectadas por personal del Ministerio de Ambiente y Control del Desarrollo Sustentable y, Subsecretaría de Pesca de la provincia y, analizadas por personal del Laboratorio de Hidrobiología de la UNPSJB Sede Trelew y personal del Laboratorio de Investigaciones en Evolución y Biodiversidad Sede Esquel, en el marco del Plan de Monitoreo de la especie invasora. A partir de 2013 se monitorean bianualmente 58 sitios (Tabla AIII.1). De todas las muestras colectadas, 300 fueron revisadas para la elaboración de este mapa en el transcurso de 4 años (Tabla 11). La revisión de estas muestras permitió corroborar los resultados (tanto negativos como positivos) que fueron incorporados en los informes elaborados en el marco del Plan de Monitoreo llevado a cabo por distintas entidades provinciales y nacionales (para ver informes: <http://www.chubut.gov.ar/portal/wp-organismos/ambiente/plan-provincial-didymo/>)

En cada sitio se tomaron muestras de plancton y perifiton. Las muestras de plancton fueron tomadas con red de 30 µm de apertura de malla mediante arrastre a contracorriente durante al menos 15 minutos en las estaciones donde no se registró al alga macroscópicamente. En el caso de las muestras de perifiton se muestrearon aquellas rocas donde se observó algún tipo de mucílago o cobertura sobre las mismas, raspándolos con un elemento cortante como cuchillo o navaja. Las muestras fueron fijadas en formol al 4% o alcohol 70%. Las estaciones de muestreo fueron posicionadas geográficamente con navegador satelital. Los muestreos se realizaron siguiendo las pautas de seguridad recomendadas a nivel nacional e internacional considerando que se trata de una especie invasora (Duncan *et al.*, 2007; Casco & Sala, 2011).

CAPÍTULO V

5.2 Materiales y métodos

Tabla 11. Sitios analizados durante la realización de esta. tesis. Al menos dos muestras fueron revisadas de cada sitio.

SITIO	COORDENADAS
Provincia del Chubut	
Río Azul	42° 05' 12.45" S - 71° 37' 10.41" O
Río Epuyén	42° 08' 58.85" S - 71° 36' 02.44" O
Río Turbio	42° 13' 46.48" S - 71° 41' 03.17" O
Arroyo Pedregoso	42° 13' 41.87" S - 71° 40' 59.70" O
Lago Puelo Norte	42° 05' 52.11" S - 71° 36' 53.35" O
Lago Puelo Sur	42° 13' 40.30" S - 71° 39' 59.40" O
Embocadura del Río Carrileufu (Cholila)	42° 28' 02.6" S - 71° 36' 03.6" O
Embocadura del Río Mosquito (Cholila)	42° 30' 19.4" S - 71° 25' 18.7" O
Río Carrileufu Desemb. en el Lago Rivadavia	43° 33' 38.7" S - 71° 37' 55.2" O
Costa del Lago Rivadavia	
Río Rivadavia confluencia con el río Colehuay	42° 40' 27.2" S - 71° 41' 56.7" O
Río Rivadavia (Canal de Doña Rosa)	42° 41' 27.3" S - 71° 42' 27.3" O
Río Rivadavia	42° 42' 33.9" S - 71° 43' 26.5" O
Río Rivadavia Desembocadura en el Lago Verde	42° 42' 37.3" S - 71° 43' 36.9" O
Costa del Lago Verde	
Río Arrayanes, Pasarela	42° 43' 34.2" S - 71° 44' 30.2" O
Río Percy (Puente Viejo)	43° 04' 22.4" S - 71° 28' 16.4" O
Río Percy (Puente Nuevo)	43° 05' 21.5" S - 71° 28' 12.9" O
Cauce viejo Presa Fualeufú	43° 07' 41.6" S - 71° 37' 43.4" O
Río Corintos (Paso Ancho)	43° 09' 41.3" S - 71° 33' 10.0" O
Río Futaleufu Paraje Las Torres	43° 10' 44.7" S - 71° 39' 01.2" O
Arroyo Baggilt Desembocadura	43° 10' 07.7" S - 71° 34' 46.9" O
Arroyo Baggilt, Boca Toma	42° 12' 11.2" S - 71° 35' 09.3" O
Piscicultura Arroyo Baggilt Canal de salida	43° 11' 55.3" S - 71° 35' 11.0" O
Piscicultura Canal de ingreso	43° 11' 59.3" S - 71° 35' 09.5" O
Piscicultura Canal de desagüe piletas	43° 11' 56.4" S - 71° 35' 10.2" O
Isla frente al lodge Chaluquen	43° 10' 23.4" S - 71° 35' 41.1" O
Arroyo Blanco (Desembocadura)	43° 10' 26.6" S - 71° 36' 23.4" O
Río Futaleufú (Recta de Toro)	43° 10' 40.0" S - 71° 37' 48.1" O
Río Futaleufú (Piedra del Inglés)	43° 10' 44.9" S - 71° 39' 07.7" O
Río Futaleufú (Isla Chica Burgos)	43° 09' 53.8" S - 71° 43' 08.3" O
Río Futaleufú (Puente Internacional)	43° 10' 04.3" S - 71° 44' 15.6" O
Río Nant y Fall	43° 13' 23.0" S - 71° 25' 16.9" O
Arroyo El Blanco, Puente ruta prov. 258	43° 11' 46.9" S - 71° 36' 25.5" O
Arroyo Pedregoso	43° 37' 53.6" S - 71° 25' 29.0" O
Río Carrenleufú o Corcovado (Pueblo)	43° 32' 35.9" S - 71° 29' 12.2" O
Río Pico (Aldea Atilio Viglione)	44° 14' 29.7" S - 71° 42' 56.3" O
Río Pampa	44° 11' 45.8" S - 71° 40' 03.6" O
Río Tecka Pte Ruta N° 40	43° 27' 44.8" S - 70° 51' 21.3" O
Río Chubut (El Maiten)	
Río Chubut (Gualjaina)	

En el Instituto de Hidrobiología de la UNPSJB sede Trelew, las muestras fueron analizadas con microscopio óptico Olympus CKX41 a fin de confirmar la presencia de la especie tanto en el plancton como en el perifiton. De cada una de las muestras se tomaron 3 submuestras. En el caso de no observar la presencia de la especie fueron revisadas 2 submuestras adicionales. Todos los materiales utilizados fueron desechados luego de la observación de cada

submuestra. De cada muestra, fueron seleccionados especímenes de *D. geminata* al azar para realizar comparaciones morfológicas y morfométricas con las poblaciones seleccionadas y descritas en el capítulo II.

La información obtenida, en diversos formatos, fue estandarizada e ingresada a la base de datos. Los datos mínimos requeridos fueron: presencia-ausencia de la especie, fecha de muestreo, coordenadas geográficas del sitio y fuente de información. Otros datos anexos (cuenca, características del sitio de muestreo, etc.), fueron incorporados pero no fueron utilizados en este primer análisis.

El procesamiento y análisis de datos se realizó utilizando planillas de cálculo (sobre todo Excel), conversores de coordenadas, conversores de formatos (Global Mapper), Google Earth. El programa de SIG utilizado es el Q-Gis Versión 2.14, de uso libre y código abierto (<http://www.qgis.org/es/site/>).

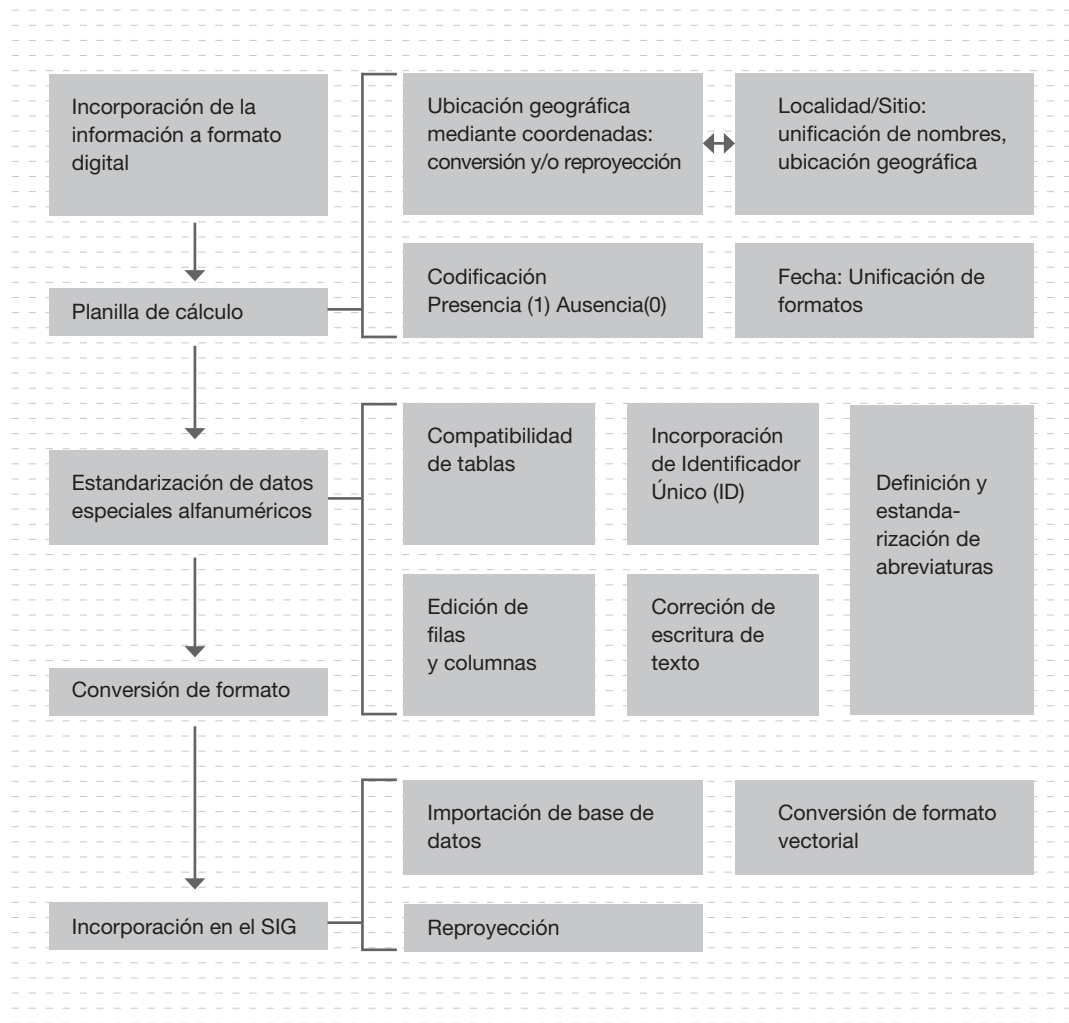
Como base cartográfica y temática para el SIG se buscó y seleccionó información oficial de Argentina: Instituto Geográfico Nacional (IGN), Administración de Parques Nacionales (APN), Infraestructura de Datos Espaciales de la República Argentina (IDERA), Sistema Federal de Áreas Protegidas (SIFAP) del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Los datos fueron obtenidos mediante descarga directa de los archivos o mediante *Web Services* (WMS y WFS). La información de base incluyó:

- Cursos de agua permanente
- Cuerpos de agua
- Límites administrativos provinciales y nacionales
- Regiones Ecológicas (o ecorregiones)
- Áreas protegidas

La metodología empleada en las diferentes etapas de procesamiento de la información se realizó según el siguiente esquema:

CAPÍTULO V

5.2 Materiales y métodos



Las capas vectoriales de base, fueron procesadas de modo de adecuar su formato así como para unificar el sistema de referencia de todo el proyecto a POSGAR 2007 Faja 2.

Material de base

Se analizaron un total de 323 registros, de la provincia de Chubut en el período Septiembre 2010-Marzo 2015.

5.3 Resultados

En Septiembre de 2010 se registró por primera vez *Didymosphenia geminata* en la Argentina, en el Río Futaleufú perteneciente a la Subcuenca Austral y Oriental de la Cuenca Futaleufú, cinco meses después de haber sido detectada en la misma cuenca en Chile (Fig. 36). En ese año, la especie alcanzó a cubrir el 15 % de la superficie del Río Futaleufú en su tramo

medio-inferior. Desde 2011 hasta la fecha, ha aumentado su cobertura a lo largo y ancho del río, cubriéndolo casi completamente en épocas de floración (Agosto-Marzo). Actualmente, las floraciones se mantienen a lo largo del año, liberando algunas pocas áreas entre los meses de mayo y agosto. En general, las floraciones en este río poseen un espesor de aproximadamente 1 cm (aunque dependiendo de la zona se las puede hallar con mayor o menos espesor) y se la puede encontrar hasta en profundidades mayores a los 2 metros. Este río es un río regulado por la Represa Futaleufú ubicada aguas arriba.

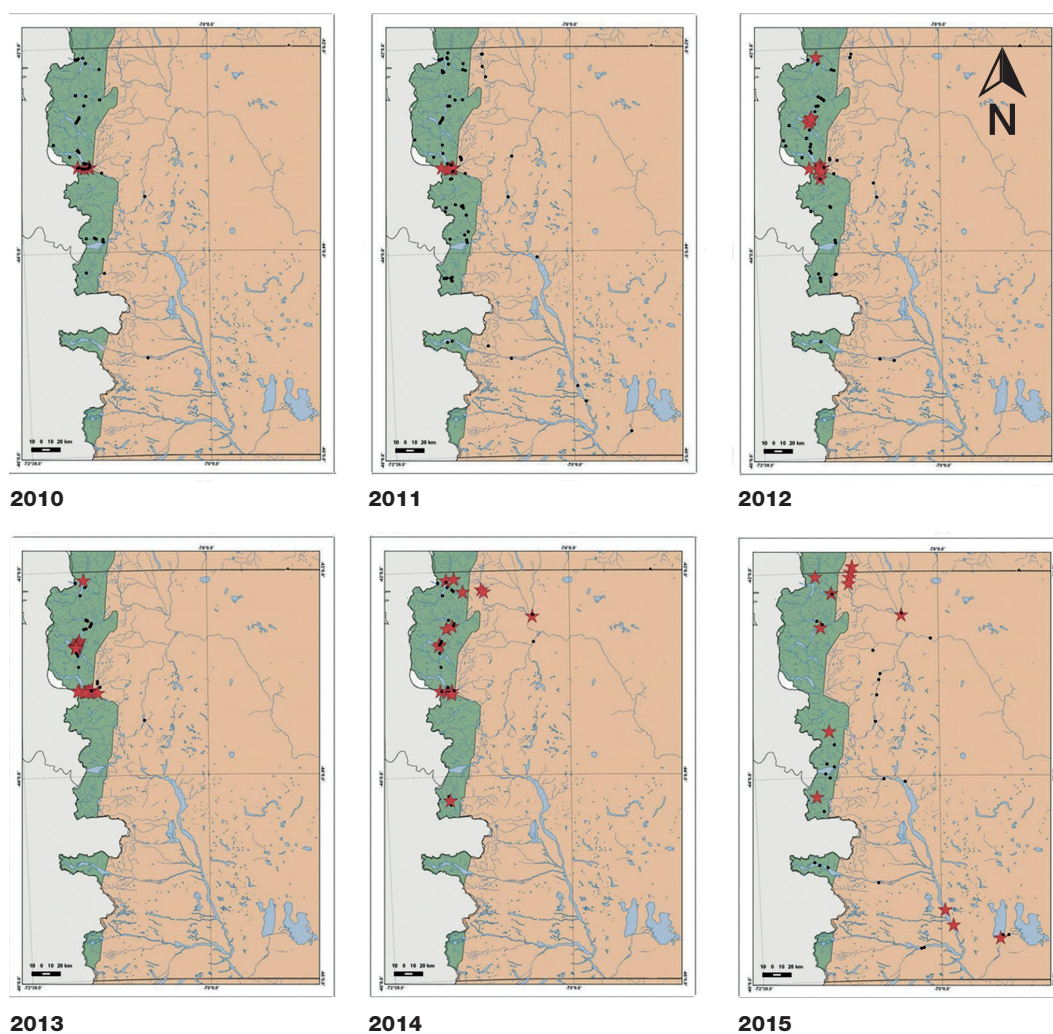


Fig. 36. Dispersión de *Didymosphenia geminata* en la provincia del Chubut desde el año 2010 al año 2015. Los puntos negros indican lugares muestreados con resultados negativos de la presencia de la especie y las estrellas rojas indican presencia de la especie. Las áreas verdes corresponden a la ecoregión de Bosque patagónico y la anaranjada a la ecoregion Estepa patagónica.

En los primeros años la dinámica de flujo del agua de la represa aparentemente reguló la dinámica de las floraciones (Fig. 37). Esta relación fue obtenida a partir de observaciones a

campo por lo que se necesitan más estudios para corroborar esta relación. Las primeras colonias fueron detectadas en primavera y, en noviembre comenzaban a colonizar distintos sustratos. Las colonias iniciales eran globosas y pequeñas y formaban parches aislados en distintos tramos del río. En estos meses, los caudales del río se mantienen relativamente constantes y no muy altos. Generalmente en los meses de diciembre y enero aumenta la corriente del río, y es después de este evento, cuando el caudal baja nuevamente y se producen las grandes floraciones cubriendo el lecho del río. En el mes de Marzo, los caudales son aún más bajos por lo que comienza la etapa de desecación, principalmente en la zona de las orillas, donde las floraciones secas se tornan de colores blanquecinos. Entre los meses de abril y mayo, el caudal del río suele aumentar manteniéndose alto hasta el mes de Agosto, observándose la remoción de gran parte de las floraciones, siendo esta la etapa de declinación y remoción. En el período que abarca desde fines de 2012- principios de 2013 hasta fines de 2015 (tiempo abarcado en este estudio), en ciertos sectores del río las floraciones persistieron durante todo el año independientemente de los caudales del río, aunque la superficie que cubrían entre los meses de Mayo y Agosto era más pequeña. Actualmente la mayoría de las floraciones se mantienen a lo largo del año y solo algunas disminuyen su tamaño, cubriendo menos metros cuadrados en invierno.

Por otro lado, es común encontrar en este río floraciones conjuntas de *D. geminata* y *Gomphoneis minuta* (Fig. 38).

En marzo de 2012 *Didymosphenia* fue detectada por primera vez en el Río Rivadavia, dentro del Parque Nacional Los Alerces, perteneciente a la Subcuenca de afluencia directa a los lagos de la Cuenca Futaleufú. En Agosto del mismo año, se registró en el Río Arrayanes dentro de la misma subcuenca, aguas abajo del Río Rivadavia. Actualmente ambos ríos poseen gran parte de sus fondos cubiertos por floraciones de la especie.

En noviembre de 2012 la especie fue registrada por primera vez en los ríos Azul y Quemquemtreu pertenecientes a la Cuenca del Lago Puelo. Las floraciones tienen una variación estacional que se ha repetido a lo largo de los años: comienzan en el mes de Agosto y declinan en Abril-Mayo. En el caso del Río Azul, se observa que las floraciones poseen un espesor de no más de 5 mm, que cubren por completo las costas del río en aquellos sitios donde las corrientes de agua no son muy fuertes. Solo en algunos tramos del río se observaron floraciones sobre sustrato vegetal, pero sin cubrirlo por completo. Desde la primera detección de floraciones de *D. geminata* en el río Azul, la dinámica de la floración se ha mantenido bastante constante en cuanto a los tramos del río que invade, superficie que ocupa en las distintas épocas del año y espesor de la floración.

En noviembre de 2013 se encontró a la especie en estado bentónico (adherida a sustratos) en el Río Chubut aguas arribas a la altura de la localidad de El Maitén, a pocos kilómetros del límite entre las provincias Chubut y Río Negro. En este sitio también se observa que la

floración comienza en Agosto, llegando a su pico máximo a fines de Febrero y, declinando en el mes de Mayo.

En el mes de marzo de 2014 se detectaron floraciones de *Didymosphenia* en el Río Epuyén. Los últimos registros correspondientes al año 2015 fueron en Febrero y en Marzo donde se la halló presente en los Ríos Senguer y Corcovado respectivamente, con la importancia que esto representa, ya que ocupa nuevas cuencas hidrográficas.

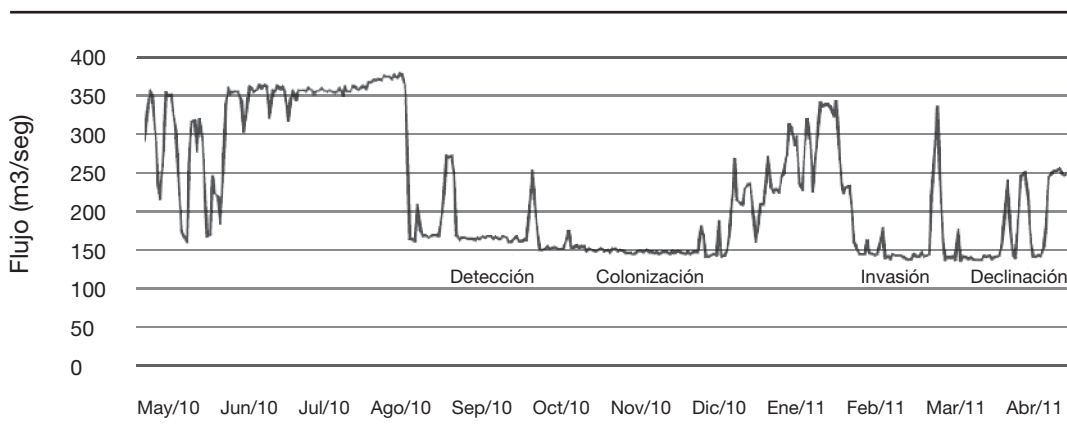
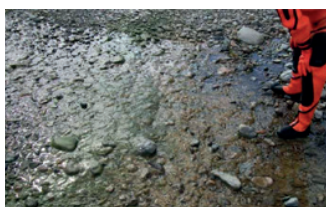
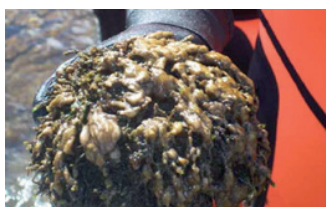


Fig. 37. Dinámica de las primeras floraciones de *D. geminata* en el Río Futaleufú en relación a los caudales de agua del río. El desarrollo de la floración fue evaluado visualmente, en función del área cubierta y las dimensiones de las colonias.



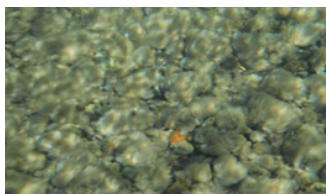
38.A



38.B



38.C



38.D



38.E



38.F

Fig. 38. Evolución de la floración de *D. geminata* a través del tiempo en el Río Futaleufú. **A-B.** Primera detección de *D. geminata* formando floraciones junto a *Gomphoneis minuta* en 2010. Fotos Gabriel Bauer. **C.** Floración a 2 metros de profundidad (las flechas indican las colonias de *Didymosphenia*). Foto Gabriel Bauer. **D.** Floración en Abril 2012 cubriendo por completo el sustrato rocoso. **E.** primera detección en un nuevo tramo del río en Abril 2012. **F.** Floración sobre epífitas sobre el mismo tramo de (E) en Noviembre de 2012.

Las pautas de manejo del problema han sido tomadas a partir de la hipótesis más aceptada para explicar este comportamiento invasivo que es el transporte de células a través de las diferentes actividades desarrolladas por el hombre en el área (turismo y pesca). Las observaciones bajo microscopio óptico de muestras tomadas de tanques para el lavado de ropa, accesorios y equipos de pesca, de los puestos de desinfección del Parque Nacional Los Alerces ubicado al noroeste de la provincia del Chubut, demostraron la presencia de células muertas de la especie. Esto muestra dos hechos: por un lado, que el hombre es un vector de transporte de *D. geminata* al menos localmente (Kilroy 2004, Spaulding & Elwell, 2007, y otros autores) y, por otro lado, que los tanques de desinfección con agua e hipoclorito o sal son efectivos a la hora de combatir a la diatomea invasora. Además se consideran como vías posibles de dispersión el transporte por parte de peces, mamíferos y aves (Bus Leone *et al.*, 2014), aunque esto no fue corroborado en este estudio, ya que si bien se analizaron muestras bajo microscopio óptico de lavado de escamas de salmónidos de ríos invadidos con *D. geminata*, no se observaron células del alga.

Los mapas temáticos obtenidos en esta primera etapa permiten observar la distribución detallada de *D. geminata* en la provincia de Chubut desde el registro de las primeras floraciones del alga y como fue colonizando nuevos ríos año a año. Los mapas muestran que los primeros sitios donde se observaron floraciones de *D. geminata*, fueron aquellos que están en cercanía o que forman parte de la misma cuenca que los ríos donde se detectó previamente *D. geminata* en el país vecino de Chile (Rivera *et al.*, 2013). Posteriormente, los mapas muestran que las floraciones se fueron esparciendo a diferentes ríos de la misma cuenca, todas dentro del Parque Nacional Los Alerces (PNA). Esto puede estar relacionado con la actividad turística en temporada de verano, ya que para marzo de 2012 las floraciones se encontraban en distintos ríos del Parque. Todos los sitios donde se encontró *D. geminata* dentro del PNA, se encuentran conectados por ríos o lagos. Generalmente, los turistas suelen realizar deportes como la pesca, remo y buceo pudiendo recorrer en el mismo día los distintos lagos, ríos y arroyos del Parque. Dado a la actividad llevada a cabo por parte del hombre dentro del Parque y a las observaciones realizadas en muestras de los tanques de desinfección, se refuerza la hipótesis que, al menos a nivel local, el hombre actúa como un vector de dispersión de *D. geminata*.

Por otro lado, la dispersión del alga a otros sitios fuera de lo que es el Parque Nacional Los Alerces, puede haber sido principalmente por la actividad de la pesca deportiva. Todos los sitios donde hoy se encuentra *Didymosphenia geminata* son sitios muy concurridos por gente que practica la pesca deportiva. Luego de haber conversado con pescadores que

pertenecen a clubes de pesca y con guías de pesca deportiva de la provincia del Chubut, en general, cuando desarrollan la actividad lo hacen por al menos varios días (de tres a más días), recorriendo distintos ríos y lagos dentro del mismo tour, pertenecientes a distintas provincias argentinas e incluso al país vecino de Chile. Coincidentemente, algunos de los sitios más populares son los que en la actualidad cuentan con la presencia del alga, por lo que es de esperar que, en aquellos sitios donde hoy no se encuentra *D. geminata* pero se desarrolla pesca deportiva, en un futuro la especie colonice estos cuerpos de agua si no se implementan planes para la desinfección de los equipos de pesca y embarcaciones, ya que, en general, los pescadores no realizan tareas de desinfección entre cambio de ríos o lagos.

En relación a estos resultados, es posible plantear nuevos interrogantes sobre el origen y la dinámica temporal y espacial de estas proliferaciones y su relación con factores ambientales y genéticos. En el capítulo anterior, se encontró un posible vínculo entre cepas argentinas y chilenas, donde se mencionó la posibilidad de una variante genética recorriendo la región. Esto podría verse soportado por lo mencionado anteriormente en relación a como es practicada la pesca deportiva en la región. Por otro lado, mucho de los turistas de los lodge de pesca de la Patagonia provienen del Hemisferio norte, particularmente de Estados Unidos (de hecho quien dio aviso de la presencia de *D. geminata* en la provincia de Tierra del Fuego fue un turista estadounidense que practica la pesca deportiva en distintos países del mundo), por lo que soportaría la hipótesis de que *D. geminata* fue introducida.

Esta nueva información permitirá determinar la existencia de patrones de distribución y estimar mediante la construcción de mapas de riesgo, las potenciales áreas de invasión.

5.5 Conclusiones

Si bien en el desarrollo de este capítulo se ha encontrado datos que soportan ambas hipótesis en menor mayor medida, es posible afirmar que *Didymosphenia geminata*, se ha comportado como una especie invasora con un alto poder de expansión en las cuencas de la Provincia del Chubut. Desde su primer registro en nuestro país, hoy se encuentra en más de 16 ríos y arroyos de 6 cuencas diferentes de la provincia. Hasta el año 2015, *Didymosphenia geminata* ocupa las cuencas de los ríos Futaleufú, Manso y Puelo, Corcovado y Pico, Chubut, y Senguer y Río Chico del Sur.

Por otro lado, es posible confirmar, que al menos a nivel local, el principal vector de dispersión de la especie es el hombre.

Es importante continuar con los análisis espaciales para poder analizar la dinámica de las floraciones en los sitios ya establecidos y en aquellos que sean colonizados.

CAPÍTULO VI

Consideraciones finales

CONSIDERACIONES FINALES

6.1 Conclusiones

Los análisis morfológicos y moleculares permitieron corroborar de manera fehaciente que la especie formadora de floraciones en la Patagonia argentina es *Didymosphenia geminata*. Si bien la morfología no siempre es suficiente para establecer los límites de las especies y las relaciones filogenéticas en diatomeas, en este caso fue posible establecer la identidad de la especie. Esto puede ser aseverado de manera fehaciente ya que fue corroborado a través de los análisis moleculares. La comparación de las poblaciones de Chubut y Tierra del Fuego desde el punto de vista molecular, mostraron la existencia de cierta variabilidad al igual que en el estudio morfológico.

Los detallados estudios físico-químicos realizados en este trabajo corroboraron el concepto de que los análisis moleculares de *Didymosphenia geminata* son un gran desafío dada la recalcitrancia a la extracción de ADN y la presencia de inhibidores enzimáticos en las células y la matriz extracelular del alga. El protocolo optimizado desarrollado en esta Tesis constituye una primera aproximación al problema y puede ser reproducido en cualquier laboratorio de biología molecular, es de bajo costo y de buen rendimiento en comparación con otros métodos. Este es el primer estudio en el cual se generan secuencias del gen COX-1 para *D. geminata*. Si bien será necesario comparar dichas secuencias con secuencias de especies relacionadas para las que no se cuenta aún con datos, la comparación de las secuencias de *D. geminata* con una gran cantidad de secuencias de diatomeas disponibles en GenBank demostró que este marcador puede ser de utilidad para la aplicación de códigos de barra de ADN en el alga.

El Objetivo general de este trabajo fue comprender la dinámica de la invasión de *Didymosphenia* en la provincia del Chubut y las posibles vías de colonización, para lo que plantearon dos hipótesis diferentes: (i) las floraciones de *Didymosphenia* en Argentina son producto de una o más introducciones favorecidas por la capacidad de la especie de permanecer viable fuera del agua por largos periodos de tiempo siendo el hombre el principal vector de dispersión; (ii) las floraciones de *Didymosphenia geminata* responden a cambios ambientales globales que han favorecido la expansión de cepas locales de la especie.

Los patrones genéticos observados muestran evidencias para las dos hipótesis, como

fue explicado en el capítulo IV. El hecho de encontrar secuencias chilenas por fuera de los clados que agrupan al resto de las secuencias de *D. geminata*, soporta la hipótesis (ii) de que *D. geminata* ha circulado en la región desde hace mucho tiempo, en coincidencia con reportes de larga data realizados en Chile (Asprey *et al.*, 1964). Vale decir, que esto indicaría que las floraciones masivas del alga podrían ser consecuencia de la expansión de poblaciones locales que hasta el momento habían pasado desapercibidas dada su muy baja abundancia y la escases de estudios. Esta hipótesis es consistente con varios estudios realizados desde 2007 (ver Introducción) los cuales han demostrado la importancia del P en el desarrollo de las floraciones masivas, sugiriendo que las mismas podrían deberse a cambios climáticos, y no al comportamiento invasivo reciente de una nueva variante genética dispersada por el hombre a nivel mundial. Por otro lado, las similitudes con secuencias de otras regiones del mundo no permite descartar la hipótesis (i) de que las floraciones *D. geminata* detectadas en el país en los últimos años, son producto de introducciones. Independientemente de cual sea la hipótesis correcta sobre la procedencia de las poblaciones presentes en argentina, como vimos en el capítulo V, las expansiones locales en Chubut, pueden deberse a las actividades llevadas a cabo por el hombre. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos y de la información recopilada, se puede plantear una nueva hipótesis: la invasión de los ambientes de América del Sur por poblaciones norteamericanas de *D. geminata* o de otras regiones del mundo ocurrió varias décadas atrás, pero la especie no produjo floraciones, debido a que las condiciones ambientales de los sitios colonizados en ese momento no fueron las adecuadas. Los cambios climáticos registrados en los últimos años (por ejemplo, inviernos menos fríos), sumados a la reciente actividad volcánica en la zona y al aumento de la actividad agrícola-ganadera llevado a cabo por el hombre, posiblemente pueden haber permitido el desarrollo de floraciones de esta especie, la que estan siendo esparcida a nivel regional por la fauna y el hombre.

Los resultados relacionados con la integración de la información en un Sistema de Información Geográfica, facilitó la comprensión de la dinámica espacio-temporal e inferencia de posibles vías de dispersión de la especie. Como es sabido, *D. geminata* posee un alto poder de colonización de diferentes ambientes. Si bien en este estudio no se contó con datos físico-químicos de los distintos cuerpos de agua donde se encuentra presente *D. geminata*, se pudo observar que sitios de diferentes altitudes, velocidad de caudales, regulados y no regulados, y con diferentes sustratos, han sido colonizados. Desde la detección de las primeras floraciones en 2010, actualmente se encuentra en más de 20 cuerpos de agua de 7 cuencas de la provincia del Chubut. Además, ha colonizado ríos no solo en la ecoregión andina de la Patagonia argentina, si no también de la estepa.

A fin de probar esta nueva hipótesis, es necesario continuar con distintos tipos de estudios. Por un lado, realizar estudios genéticos con marcadores moleculares más variables

en conjunto con la secuenciación de especies pertenecientes a géneros cercanos. Un primer paso sería llevar a cabo análisis filogenéticos de dos o más genes en conjunto. Posteriormente, sería interesante la confección de una matriz con datos genéticos y morfológicos, que permita llevar a cabo un análisis filogenético conjunto.

Paralelamente, sería de gran relevancia la implementación de un nuevo estudio basado en el análisis de transcriptomas, ya que permitiría cuantificar la expresión de genes en las distintas poblaciones permitiendo entender un poco más sobre el comportamiento y biología de la especie.

Por otro lado, frente a las ventajas que presenta una herramienta como el SIG, es importante continuar con el registro de la dispersión de las floraciones en el país, con la incorporación de datos físico-químicos de los cuerpos de aguas, de la actividad volcánica de los últimos años, de las actividades de pesca deportiva y la incorporación de los nuevos datos genéticos, morfológicos y morfométricos. Todos estos datos analizados en conjunto ayudará a entender un poco más el comportamiento de la especie en la Patagonia argentina.

Este trabajo es un primer paso en el estudio de las características y origen de las poblaciones de *Didymosphenia geminata* en Argentina, quedando demostrado que es necesario un enfoque interdisciplinario para poder entender este tipo de fenómenos, que en los últimos años, se han incrementado a nivel mundial.

6.2 Recomendaciones

Independientemente de que no fue posible determinar si las floraciones de *D. geminata* son producto de expansiones de cepas locales o introducciones realizadas por el hombre, hasta el momento no se conoce un método para minimizar los efectos de las floraciones de *Didymosphenia geminata* de los cuerpos de agua. Si bien en la Patagonia Argentina no se han registrado impactos negativos severos más allá del deterioro estético del paisaje, es altamente recomendable llevar a cabo estudios sobre el estado de las redes tróficas de los ambientes acuáticos patagónicos, teniendo en cuenta que la pesca es uno de los deportes más practicados por turistas nacionales y extranjeros.

Por otro lado, es de suma importancia mantener los planes de desinfección en las áreas que hoy se encuentran invadidas por el alga para así evitar que siga dispersándose a nuevos cuerpos de agua. En relación a estos planes, es necesario profundizar las campañas de concientización dirigidas a la población general de la Patagonia y a aquellos que utilizan las áreas invadidas y vulnerables a ser invadidas, sobre la importancia de los buenos hábitos en el uso de los ambientes acuáticos. Como fue mencionado en este estudio, los equipos utilizados en los ambientes invadidos son vectores de traslado de la microalga a nuevos ambientes. Es por esto, que es importante que el turista implemente el uso de kits de desinfección como parte

del equipo utilizado en la pesca o cualquier otra actividad que se realice en cualquier cuerpo de agua. Estos kits deberían contar con:

- 1 botella de desinfectante biodegradable (detergentes) o hipoclorito (Lavandina).
- 1 bolsa de sal gruesa.
- 1 cepillo.
- 1 fuentón para la desinfección y el enjuague de los equipos en agua con sal o hipoclorito.
- 1 bidón con agua libre de *D. geminata* (por ejemplo, bidón con agua corriente de la red de agua potable).

Como primer paso, una vez que el visitante sale de un cuerpo de agua, debe **remover** todo aquel resto de sedimento o sustrato visible sobre los elementos que vaya a limpiar utilizando un cepillo si fuera necesario. Los restos debe colocarlos en bolsas de residuos. Posteriormente se debe **lavar** todo lo que haya estado en contacto con el agua, sin importar si observa las floraciones de *D. geminata* o no en el cuerpo de agua donde se desarrolló la actividad. Para esto, debe colocar todos los elementos en el fuentón que contiene agua con hipoclorito al 5% (es decir 50 ml cada 1 litro de agua) y dejarlo reposar por al menos 2 minutos. Luego, enjuagar en el fuentón de agua libre de “didymo”. En el caso de que no se cuente con estos elementos, una vez que se abandona un cuerpo de agua, retirar todo el sedimento de los equipos y secar al sol por al menos 48 hs hasta que no se observen zonas húmedas. Recién en este momento, los equipos pueden ser utilizados nuevamente. Además, evitar el uso de telas que absorben agua (como felpas antideslizantes en las botas de los trajes de pesca) disminuye el riesgo de traslado del alga a nuevos sitios ya que mantienen la humedad por más tiempo y son más difíciles de lavar. Para mayor detalle se recomienda seguir los protocolos de AMAKAIK (2016), confeccionados por especialistas, argentinos y chilenos, en el tema. Este procedimiento puede tomar tan solo 10 minutos y puede evitar años de daños ecológico. También la implementación de campañas sobre este tema en las escuelas.

Por otro lado, es importante que la Autoridad responsable de la toma de decisiones respecto al manejo de este tipo de fenómenos, cuenten con toda la información disponible. Herramientas como los SIG, son recomendables, ya que permiten poder visualizar los distintos tipos de información conjuntamente. Es por esto, la relevancia del trabajo en conjunto de los distintos actores (autoridades gubernamentales, distintos organismos como la Administración de Parque Nacionales, profesionales idóneos del tema, guías de pesca, turistas y población general). En mi opinión, de esta manera, el diseño y aplicación de los distintos programas (como de educación sobre el uso de los recursos acuáticos, planes de prevención, monitoreos y control), permitirán mejores resultados.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ABOAL, M., S. MARCO, CHAVES, E., MULERO, I. & GARCÍA-AYALA, A. 2012. Ultrastructure & function of the stalks of the diatom *Didymosphenia geminata*. *Hydrobiologia* 695: 17-24.\\
- ABRAMOFF, M. D., MAGELHAES, P. J. & RAM, S. J. 2004. Image Processing with Image J. *308 Biophotonics International* 11: 36-42. \\
- ALDRICH, J. & CULLIS, C.A. 1993. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq 1 DNA polymerase, Chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 128–141. \\
- ALJANABI, S.M & MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25, 4692–4693. \\
- ALLENDORF, F. W. & LUNDQUIST, L. L. 2003. Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology* 17 (1):24-30. \\
- AL-SOUD, W.A. & RÅDSTRÖM, P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 485–493. \\
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403-10. \\
- AMALFITANO, S., COCI, M., CORNO, G. & LUNA, G. M. 2015. A microbial perspective on biological invasions in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia* 746 (1):13-22 doi:10.1007/s10750-014-2002-6. \\
- ANDERSEN, R. A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier. Academic Press. 578 pp. \\
- APHA. 1995. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association. Pg 2-4, 29-179. \\
- ASPREY, J. F., BENSON-EVANS, K. & FURET, J. E. 1964. A contribution to the study of South American freshwater phytoplankton. *Gayana Botánica* 10:118. \\
- AVISE, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: A personal reflection. *Molecular Ecology*. 7: 371-379. \\
- AVISE, J. C., J. ARNOLD, R. M. BALL, JR., E. BERMINGHAM, T. LAMB, J. E. NEIGEL, C. A. REEB Y N. C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522. \\
- BAR, T., KUBISTA, M. & TICHOPAD, A. 2012. Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic Acids Research* 40: 1395-406. \\

BAUER, G., SASTRE, V. & SANTINELLI, N. 2011. Monitoreo de *Didymosphenia geminata*. Informe preliminar del muestreo del día 25 de Febrero de 2011. Laboratorio de Hidrobiología, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew-Esquel. 8 pp.

BEAMUD, G., BAFFICO, G., PEDROZO, F. & DÍAZ, M. 2013. First record of the invasive algae *Didymosphenia geminata* in the Lake Nahuel Huapi: Argentina, Patagonia. *Revista Chilena Historia Natural* 86: 493-496. \\\

BEAMUD, S. G., BAFFICO, G., REID, B., TORRES, R., GONZALEZ-POLO, M., PEDROZO, F. & DIAZ, M. 2016. Photosynthetic performance associated with phosphorus availability in mats of *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae) from Patagonia (Argentina and Chile). *Phycologia* 55(2):118-125. \\\

BEEBY, J. 2012. Water quality and survivability of *Didymosphenia geminata*. Thesis for the Degree of Master of Science. Colorado State University. Fort Collins, Colorado. Pp 89. \\\

BEHRENDT, H. & OPITZ, D. 2001. Preliminary approaches for the classification of rivers according to the indicator phytoplankton. *TemaNord* 32-36. \\\

BELTRAMI, M.E., CAPPELLETI, C. & CIUTTI, F. 2008. *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt (Bacillariophyta) in the Danube basin: new data from the Drava river (northern Italy). *Plant Biosystems* 142: 126-129. \\\

BERGEY, E.A., COOPER, J.T. & TACKETT, C.R. 2009. Occurrence of the invasive diatom *Didymosphenia geminata* in Southeast Oklahoma. *Publications of the Oklahoma Biological Survey* 9: 13-15. \\\

BEY, B.S., FICHOT, E.B., DAYAMA, G., DECHO, A.W. & NORMAN, R.S. 2010. Extraction of high molecular weight DNA from microbial mats. *Biotechniques* 49: 631-640. \\\

BHATT, J. P., BHASKAR, A. & PANDIT, M. K., 2008. BIOLOGY, distribution and ecology of *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt an abundant diatom from the Indian Himalayan rivers. *Aquatic Ecology* 42: 347-353. \\\

BIGGS, B. & CLOSE, M. 1989. Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flow and nutrients. *Freshwater Biology* 22: 209-231. \\\

BIGGS, B.J.F., KILROY, C. & VIEGLAIS, C.C. 2006. A New Zealand science response to help manage *Didymosphenia geminata* - an unwanted diatom invader of freshwaters. In: S. Spaulding, R. Wiltshire, L. Elwell (Eds.), *Current knowledge of Didymosphenia geminata: Developing a research and management response*, Federation of Fly Fishers and EPA Region 8, held in association with Western Division American Fisheries Society Annual Meeting, Montana State University, Montana, USA, pp. 7.

BLANCO, S. & ECTOR, L. 2008. *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyta, Gomphonemataceae) una amenaza para nuestros ríos. *Cuadernos de Biodiversidad* 28: 3-6. \\\

BLANCO, S. & ECTOR, L. 2009. Distribution, ecology and nuisance effects of the fres-

freshwater invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: a literature review. Nova Hedwigia 88:3-4. 347-422. \\\

BOTHWELL, M. L., KILROY, C., TAYLOR, B. W., ELLISON, E.T., JAMES, D. A., GILLIS, C.-A., BLADON, K. D. & SILINS, U. 2012. Iron is not responsible for *Didymosphenia geminata* bloom formation in phosphorus-poor rivers. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 69: 1723-1727. \\\

BOTHWELL, M.L., LYNCH, D.R., WRIGHT, H. & DENISEGER, J. 2009. On the boots of fishermen: the history of didymo blooms on Vancouver Island, British Columbia. Fisheries 34: 382-388. \\\

BOTHWELL, M. L. & SPAULDING, S.A. 2008. Synopsis of the 2007 International Workshop on *Didymosphenia geminata*, in: Bothwell, M. L. and Spaulding, S.A. (Ed.), International Workshop on *Didymosphenia geminata*. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2795, Montréal, Québec, pp. 13-21. \\\

BOTHWELL, M.L., TAYLOR B. W. & KILROY, C. 2014. The Didymo story: the role of low dissolved phosphorus in the formation of *Didymosphenia geminata* blooms. Diatom Research 29: 229-236. \\\

BROWN, R.L. AND PEET, R.K. 2003. Diversity and invisibility of southern Appalachian plant communities. Ecology 84: 32-39.

BRUDER, K. & MEDLIN, L. K. 2007. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. Nova Hedwigia 8: 331-352.

BURGOS GONZÁLEZ, J. M. 2010. Presencia de *Didymosphenia geminata* en Río Espolón y Río Futaleufú, Región de los Lagos. Propuesta de área de plaga. Informe técnico D. AC. 2064/2010. Subsecretaría de Pesca. Gobierno de Chile. 24 pp. \\\

BURROUGH, P.A. 1986. Principles of Geographic Information Systems for Land Resource Assessment., in: Publications, O.S. (Ed.), Monographs on Soil and Resources Survey. New York. \\\

BUS LEONE, P., CERDA, J., SALA, S.E. & REID, B. 2014. Mink (*Neovison vison*) as a natural vector in the dispersal of the diatom *Didymosphenia geminata*. Diatom Research 29: 259-266. \\\

CAI, W., LI, C., LIN, Q., JIA, X., YANG, M. & ZHANG, H. 2005. Horizontal distribution of phytoplankton quantity and the correlation with the nutrients in culturing waters of Kaozhou Bay based on GIS. Chinese Journal of Ecology 5:513 \\\

CAMPBELL, M. 2005. Organism impact assessment (OIA) for potential impacts of *Didymosphenia geminata*. All Oceans Ecology Report. 92 pp. \\\

CANTER-LUND, H. & LUND, J. W. G. 1995. Freshwater Algae. Their Microscopic World Explored. BioPress, Bristol. \\\

CARY, S.C., HICKS, B. J., CRAWFOD, N. J. & COYNE, C. 2006. A sensitive genetic based detection capability for *Didymosphenia geminata*. Interim CBER Contract Report 45. Client report prepared for MAF Biosecurity New Zealand. Centre for Biodiversity and Ecology Research, The University of Waikato, Hamilton. \\\

CARY, S. C., HICKS, B. J., COYNE, K. J., RUECKERT, A., GEMMILL, C. E. C. & BARNETT, C. M. E. 2007. A sensitive genetic-based detection capability for *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: phases two and three. CBER Contract Report 62, prepared for MAF Biosecurity New Zealand. Centre for Biodiversity and Ecology Research, The University of Waikato. \\\

CARY, S. C., COYNE, K. J., RUECKERT, A., WOOD, S. A., KELLY, S., GEMMILL, C. E. C., VIEGLAIS, C. & HICKS, B. J. 2014. Development and validation of a quantitative PCR assay for the early detection and monitoring of the invasive diatom *Didymosphenia geminata*. Harmful Algae 36: 63–70. \\\

CASCO, M. A. & SALA, S. E. 2011. Propuesta de protocolo para la detección y seguimiento de *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt en el área andina patagónica, Argentina. Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay Neuquén y Negro. \\\

CASQUET, J., THEBAUD, C. & GILLESPIE, R.G. 2012. Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. Molecular Ecology Resources 12: 136–141. \\\

CHAPMAN, V. J., THOMPSON, R. H. & SEGAR, E. C. M. 1957. Check list of the fresh-water algae of New Zealand. Transaction of the Royal Society of New Zealand 84(4): 695–747. \\\

CLEMENS, W. A., RAWSON, D. S. & MCHUGH, J. L. 1939. A biological survey of Okanagan Lake, British Columbia. Bulletin Fisheries Research Board of Canada 56: 1–70. \\\

CLEVE, P. T. 1894-1896. Synopsis of the Naviculoid Diatoms. Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar. Stockholm. 26: 1-194, Pls. 1-5 (1894); 27: 1-219, Pls. 1-4. \\\

COTA SANCHEZ, J.H., REMARCHUK, K. & UBAYASENA, K. 2006. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. Plant Molecular Biology Reporter 24: 161–167. \\\

COX, E. J. 1996. Identification of Freshwater Diatoms From Live Material. Chapman & Hall, London. \\\

CRÉACH, V., ERNST, A., SABBE, K., VANELSLANDER, B., VYVERMAN, W., & STAL, L. J. 2006. Using quantitative PCR to determine the distribution of a semicryptic benthic diatom, *Navicula phyllepta* (BACILLARIOPHYCEAE). Journal of phycology. 42(5):1142-1154. \\\

CULLIS J. D. S., GILLIS C-A, BOTHWELL M. L., KILROY C., PACKMAN A. & HASSAN M. 2012. A conceptual model for the blooming behavior and persistence of the benthic mat-forming diatom *Didymosphenia geminata* in oligotrophic streams. Journal of Geophysical

Research 117: G00N03, <http://dx.doi.org/10.1029/2011JG001891>. \\\

DALE, B., EDWARDS M. & REID, C. P. 2003. Climate change and harmful Algal Blooms. In Granéli, E., J. T. Turner (Eds.). *Ecology of Harmful Algae*: 1-413, Springer Berlin. \\\

DAY, S. A., WICKHAM, R. P., ENTWISLE, T. J. & TYLER, P. A. 1995. Bibliographic checklist of non-marine algae in Australia. *Flora of Australia Supplementary Series 4*: vii + 276. \\\

DAWSON, P. A. 1973a. The morphology of the siliceous components of *Didymosphaenia geminata* (Lyngb.) M. Schm. *European Journal of Phycology* 8: 65-78. \\\

DAWSON, P. A. 1973b. Further observations on the genus *Didymosphaenia* M. Schmidt—*D. Sibirica* (Grun.) M. Schm. *European Journal of Phycology* 8: 97-201. \\\

DILERNIA D. A., JONES, L. R., RODRIGUEZ, S., TURK, G., RUBIO, A. E., PAMPURO, S., GOMEZ-CARRILLO, M., BAUTISTA, C., DELUCHI, G., BENETUCCI, J., LASALA, M. B., LOURTAU, L., LOSSO, M.H., PEREZ, H., CAHN, P. & SALOMÓN, H. 2008. HLA-Driven Convergence of HIV-1 Viral Subtypes B and F Toward the Adaptation to Immune Responses in Human Populations. *PLoS One* 3429. \\\

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15. \\\

DUNCAN, M., KILROY, C., VIEGLAIS, C. & VELVIN, F. 2007. Protocol for the collection of samples for delimiting surveys for *Didymosphenia geminata* for microscopic analysis. National Institute of Water & Atmospheric Research, New Zealand. Client Report: CHC2007-110. \\\

EHARA, M., INAGAKI, Y., WATANABE, K., OHAMA, T. 2000. Phylogenetic analysis of diatom *cox-1* genes and implications of a fluctuating GC content on mitochondrial genetic code evolution. *Current Genetics* 37:29 doi: 10.1007/s002940050004. \\\

EHRlich, H., MOTYLENKO, M., SUNDARESHWAR, P. V., ERESKOVSKY, A., ZGŁOBICKA, I., NOGA, T., PŁOCIŃSKI, T., TSURKAN, M. V., WYROBA, E., SUSKI, S., BILSKI, H., WYSOKOWSKI, M., STÖCKER, H., MAKAROVA, A., VYALIKH, D., WALTER, J., MOLODTSOV, S. L., BAZHENOV, V. V., PETRENKO, I., LANGER, E., RICHTER, A., NIEDERSCHLAG, E., PISAREK, M., SPRINGER, A., GELINSKY, M., RAFAJA, D., WITKOWSKI, A., MEYER, D. C., JESIONOWSKI, T. & KURZYDŁOWSKI, K. J. 2016, Multiphase Biomineralization: Enigmatic Invasive Siliceous Diatoms Produce Crystalline Calcite. *Advanced Functional Materials* 26: 2503–2510. doi:10.1002/adfm.201504891. \\\

ELTON, C.S. 1958: The ecology of invasions by animals and plants. Chicago: University of Chicago Press. \\\

ELLWOOD, N. T. W. & WHITTON, B. A. 2007. Importance of organic phosphate hydrolyzed in stalks of the lotic diatom *Didymosphenia geminata* and the possible impact of climate change. *Hydrobiologia* 592: 121–133. \\\

ENEVOLDSEN, H. O. & AGUILERA, A. 2002. Organizaciones internacionales y regionales relacionadas con programas y actividades sobre Floraciones Algales Nocivas. En Sar E.A.,

M.E. Ferrario & B. Reguera (Eds.). Microalgas marinas productoras de toxinas presentes en el Cono Sur Americano: 291-305. Instituto Español de Oceanografía. Madrid. \\\

EVANS, K. M. WORTLEY, A. H. & MANN, D. G. 2007. An assessment of potential diatom “Barcode” Genes (*cox1*, *rbcL*, 18S & ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* 158:349-364. \\\

FALASCO, E. & BONA, F. 2013. Recent findings regarding non-native or poorly known diatom taxa in north-western Italian rivers. *Journal of Limnology* 72: 35–51. \\\

FERRARIO, M. E., SAR, E. A. & SALA, S. E. 1995. Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. En: Alveal K, ME Ferrario, EC Oliveira and E Sar (eds) Manual de métodos ficológicos: 1-23. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. \\\

FITZHUGH, T.W. 2005. GIS Tools for Freshwater Biodiversity Conservation Planning. *Trans GIS* 9:247-263. doi:10.1111/j.1467-9671.2005.00215. \\\

GIANSANTE, C. & PELINI, S. 2007. The use of geographic information systems in sea and freshwater ecosystems. *Veterinaria Italiana* 3: 507-512. \\\

GILLIS, A. & CHALIFOUR, M. 2010. Changes in the macrobenthic community structure following the introduction of the invasive algae *Didymosphenia geminata* in the Matapedia River. *Hydrobiologia* 647: 63–70. doi:10.1007/s10750-009-9832-7. \\\

GILLIS, C. A. & LAVOIE, I. 2014. A preliminary assessment of the effects of *Didymosphenia geminata* nuisance growths on the structure and diversity of diatom assemblages of the Restigouche River basin, Quebec, Canada. *Diatom Research* 29: 281-292. \\\

GOLOBOFF P. A, FARRIS, J. S. & NIXON, K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786. \\\

GRAHAM, L. E. & WILCOX, L. W. 2000. *Algae*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ. \\\

GREEN, H. C. & FIELD, K. G. 2012. Sensitive detection of sample interference in environmental qPCR. *Water Research* 46: 3251-60. \\\

GREEN, M. R., SAMBROOK, J. & MACCALLUM, P. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press. \\\

GRETZ, M.R. 2008. The stalks of didymo. In: Bothwell, M.L., Spaulding, S.A. (Eds.), *Proceedings of the 2007 International Workshop on Didymosphenia geminata*, vol. 2795, p. 21. \\\

GRETZ, M. R., RICCIO, M. L., HUNGWE, T. R., BURGER, H. M., KIEMLE, S. N., APOYA, M. D. & SPAULDING, S. A. 2006. Extracellular polymers of the stalked diatom *Didymosphenia geminata*. In Spaulding, S., R. Wiltshire & L. Elwell (conference organizers), *Current Knowledge of Didymosphenia geminata: Developing a Research and Management Response*. Federation of Fly Fishers and EPA Region 8, held in association with Western Division American Fisheries Society Annual Meeting, May 15–16, 2006, Montana State University, Montana, USA: 29 pp, p. 13. \\\

- GUINDON, S. & GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 52: 696-704. \\\
- GUINDON, S., DUFAYARD, J. F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., GASCUEL, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3):307-21. \\\
- GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2015. AlgaeBase. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> [searched on 27 May 2015]. \\\
- GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2017. AlgaeBase. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> [searched on 9 January 2017]. \\\
- GUO, L., SUI, Z., ZHANG, S., REN, Y., & LIU, Y. 2015. Comparison of potential diatom 'barcode' genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, *rbcL*) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 1369-1380. \\\
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium series* 41: 95-98. \\\
- HALLEGRAEF, G. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycology* 32:79-99. \\\
- HAMMOND, V. A. 2013. The invasion ecology of *Didymosphenia geminata* in New Zealand. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Otago, Dunedin. \\\
- HASLE, G. & FRYXELL, G. 1970. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. *Transactions of the American Microscopical Society* 89: 469-474. \\\
- HASLETT, J.R., 1990. Geographic information systems: A new approach to habitat definition and study of distributions. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 214-218. \\\
- HIJMANS, R.J., CRUZ, M., ROJAS, E. & GUARINO, L. 2001. DIVA-GIS version 1.4 : A geographic information system for the analysis of biodiversity data. User Manual. \\\
- HOLLANDER, M. & WOLFE, D.A. 1999. *Nonparametric Statistical Methods*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. \\\
- HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755. \\\
- ISHI, K & FUKUI, M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3753-3755. \\\
- IWATANI, N., MURAKAMI, S. & SUZUKI, Y. 2005. A sequencing protocol of some DNA regions in nuclear, chloroplastic and mitochondrial genomes with an individual colony of *Thalassiosira nordenskioeldii* Cleve (Bacillariophyceae). *Polar Bioscience* 18: 35-45. \\\
- JACKSON, D. P., LEWIS, F. A., TAYLOR, G. R., BOYLSTON, A. W. & QUIRKE, P. 1990. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *Journal of*

Clinical Pathology 43: 499–504. \\\

JACKSON, L.J., CORBETT, L. & SCRIMGEOUR, G. 2016. Environmental constraints on *Didymosphenia geminata* occurrence and bloom formation in Canadian Rocky Mountain lotic systems. Canadian journal of fisheries and aquatic sciences 73(6): 964-972. \\\

JAMES, D. A. & CHIPPS, S. R. 2016. Influence of *Didymosphenia geminata* Blooms on Prey Composition and Associated Diet and Growth of Brown Trout. Transactions Of The American Fisheries Society. doi: 10.1080/00028487.2015.1111255. \\\

JARAMILLO, A., OSMAN, D., CAPUTO, L. & CARDENAS, L. 2015. Molecular evidence of a *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae) invasion in Chilean freshwater systems. Harmful Algae 49:117–123. \\\

JELLYMAN, P. G., CLEARWATER, S. J., CLAYTON, J. S., KILROY, C., BLAIR, N., HICKY, C. W. & BIGGS, B. J. 2011. Controlling the invasive diatom *Didymosphenia geminata*: an ecotoxicity assessment of four potential biocides. Archives of Environmental Contamination Toxicology 61: 115-127. \\\

JONES, P., BEEBE, S., TOHME, J. & GALWEY, N. 1997. The use of geographical information systems in biodiversity exploration and conservation. Biodiversity and Conservation 947–958. \\\

JONES, H. M., SIMPSON, G. E., STICKLE, A. J. & MANN, D. G. 2005. Life history and systematics of *Petroneis* (Bacillariophyta) with special reference to British waters. European Journal of Phycology 40: 61-87. \\\

JÓNSSON, G. S., JÓNSSON, I. R., BJÖRNSSON M. & EINARSSON S. M. 2000. Using regionalization in mapping the distribution of the diatom species *Didymosphenia geminata* (Lyngb.) M. Schmidt in Icelandic rivers. Verhandlung Internationale Vereinigung Limnologie 27: 340–343. \\\

JULIUS, M. L. 2007. Perspectives on the evolution and diversification of the diatoms. Pond Scum to Carbon Sink: Geological and Environmental Applications of the Diatoms, Paleontological Society Short Course, October 27, 2007. Paleontological Society Papers, Volume 13, Starratt, S. (Ed.). Copyright © 2007 The Paleontological Society. \\\

KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K. & MIYATA, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Symposium 30:3059-3066. \\\

KAWECKA, B. & SANECKI, J. 2003. *Didymosphenia geminata* in running waters of southern Poland –symptoms of change in water quality? Hydrobiologia 495: 193-201. \\\

KELLER, S. R., HILDERBRAND, R. H., SHANK, M. K. & POTAPOVA, M. 2017. Environmental DNA genetic monitoring of the nuisance freshwater diatom, *Didymosphenia geminata*, in eastern North American streams. Diversity and Distributions 2017:1-13. \\\

KELLY, S. R. 2009. The origin, genetic diversity and taxonomy of the invasive diatom

Didymosphenia geminata (bacillariophyceae) in New Zealand. Thesis. The University of Waikato; New Zealand. 223 pp. \\\

KERMARREC, L., ECTOR, L., BOUCHEZ, A., RIMET, F. & HOFFMAN, L. 2011. A preliminary phylogenetic analysis of the Cymbellales based on 18S rDNA gene sequencing. *Diatom Research* 26: 305-315. \\\

KHAN-BUREAU, D. A., MORALES, E. A., ECTOR, L., BEAUCHENE, M. S. & LEWIS, L. A. 2016. Characterization of a new species in the genus *Didymosphenia* and of *Cymbella janischii* (Bacillariophyta) from Connecticut, USA. *European Journal of Phycology*, DOI: 10.1080/09670262.2015.1126361. \\\

KILROY, C. 2004. A new alien diatom, *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt: its biology, distribution, effects and potential risks for New Zealand fresh waters. NIWA Client Report: CHC2004-128. A report prepared for Environment Southland. National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd, Christchurch. \\\

KILROY, C., BIGGS, B. J. F. & VYVERMAN, W. 2007. Rules for macroorganisms applied to microorganisms: patterns of endemism in benthic freshwater diatoms. *Oikos* 116: 550-564. \\\

KILROY, C. & BOTHWELL M. L. 2011. Environmental control of stalk length in the bloom-forming, freshwater benthic diatom *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 47(5): 981-989. \\\

KILROY, C. & BOTHWELL, M.L. 2012. *Didymosphenia geminata* growth rates and bloom formation in relation to ambient dissolved phosphorus concentration. *Freshwater Biology* 57: 641-653. \\\

KILROY, C. & DALE, M. 2006. A comparison of sampling methods for the detection of the invasive alga *Didymosphenia geminata* in New Zealand. NIWA Client Report: CHC2006-078. \\\

KILROY, C., JARVIE, B. & SUTHERLAND, S. 2005 b. Nuisance growths of periphyton in the lower Waiau River in relation to flow; a summer monitoring programme with a focus on *Didymosphenia geminata*. National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand. Consultancy report CHC05_59. 51 pp. \\\

KILROY, C., LAGERSTEDT, A., DAVEY, A. & ROBINSON, K. 2006. Studies on the survivability of the exotic, invasive diatom *Didymosphenia geminata* under a range of environmental and chemical conditions. Niwa Client Report: Chc2006-116, Niwa Project Maf06506. 116 pp. \\\

KILROY, C., LAMBERT, P., ROBINSON, K. & BLAIR, N. 2005 a. Periphyton and invertebrate monitoring programme, lower Waiau River. Results of the 2005 survey and a commentary on the ecological effects of *Didymosphenia geminata*. National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand Consultancy Report 2005-032. 45 pp. \\\

KILROY, C. & LARNED, S. 2016. Contrasting effects of low-level phosphorus and nitrogen enrichment on growth of the mat-forming alga *Didymosphenia geminata* in an oligotrophic river. *Freshwater Biology* 61:1550-1567. doi:10.1111/fwb.12798. \\\

KILROY, C., LARNED, S. T. & BIGGS, B. J. F. 2009. The non-indigenous diatom *Didymosphenia geminata* alters benthic communities in New Zealand rivers. *Freshwater Biology* 54: 1990–2002. \\\

KILROY, C., SNELDER, T. & SYKES, J. 2005c. Likely environments in which the non-indigenous freshwater diatom can survive, in New Zealand. National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand. Consultancy Report 2005-043. 34 pp. \\\

KILROY, C. & UNWIN, M. 2011. The arrival and spread of the bloomforming, freshwater diatom, 398 *Didymosphenia geminata*, in New Zealand. *Aquatic Invasions* 6: 249–262. \\\

KIRKWOOD, A. E., SHEA, T., JACKSON, L. J. & MCCAULEY, E. 2007. *Didymosphenia geminata* in two Alberta headwater rivers: an emerging invasive species that challenges conventional views on algal Bloom development. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64: 1703–1709. \\\

KIRKWOOD, A. E., JACKSON, L. J. & MCCAULEY, E. 2009. Are dams hotspots for *Didymosphenia geminata* blooms? *Freshwater Biology* 54: 1856–1863. \\\

KIRKWOOD, A. E., JACKSON, L. J. & MCCAULEY, E. 2008. *Didymosphenia geminata* distribution and bloom formation along the south-eastern slopes of the Canadian Rockies. 2007 International Workshop on *Didymosphenia geminata*, Canadian Technical Report on Fisheries and Aquatic Sciences. \\\

KOCIOLEK, J. P. & STOERMER, E. F., 1988. A preliminary investigation of the phylogenetic relationships of the freshwater, apical pore field-bearing cymbelloid and gomphonemoid diatoms (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 24: 377–385. \\\

KOCIOLEK, J. P. & STOERMER, E. F. 1993. Freshwater gomphonemoid diatom phylogeny: Preliminary results. *Hydrobiologia* 269/270: 31–38. \\\

KOCIOLEK, J.P. 1998. Does each genus of diatoms have at least one unique feature?—A reply to Round. *Diatom Res.* 13: 177–179. \\\

KOCIOLEK, J. P. & SPAULDING, S. A. 2003. Eunotioid and asymmetrical naviculoid diatoms. In: *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (Eds Wehr JD, Sheath RG), pp. 655–668. Academic Press, USA. \\\

KOCIOLEK, J. P., YOU, Q., WANG, X. & LIU, Q. 2015. Consideration of some interesting freshwater gomphonemoid diatoms from North America and China, and the description of *Gomphosinica*, gen. nov. *Nova Hedwigia, Beihefte* 144: 175–198. \\\

KOLMAKOV, V. I., ANISHCHENKO, O. V., IVANOVA, E. A., GLADYSHEV, M. I., SUSHCHIK, N. N. 2008. Estimation of periphytic microalgae gross primary production with DCMU-fluorescence method in Yenisei River (Siberia, Russia). *Journal of Applied Phycology* 20: 289–297. \\\

KOMULAYNEN, S. F. 2008. The structure and distribution of phytoperiphyton community in the Teno River and its tributaries (Finnish Lapland). *Boreal Environment Research*, 13, 1–8. \\\

— KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H., 1986. Naviculaceae. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.), Bacillariophyceae, Part 1. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Vol. 2. Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 876. \\\

KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1997. Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2/1. Bacillariophyceae. 1. Naviculaceae. Jena, Fischer. \\\

KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1999. Bacillariophyceae. Naviculaceae. In Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa 2/1. Akad. \\\

KUHAJEK, J. & WOOD, S., 2013. Didymo phase 4: the influence of water chemistry and biofilm composition on *Didymosphenia geminata* establishment. Report No. 2347, Cawthron Institute, New Zealand. \\\

KUMAR, S., SPAULDING, S. A, STOHLGREN, T. J., HERMANN, K. A., SCHMIDT, T. S. & BAHLS, L. L. 2009. Potential habitat distribution for the freshwater diatom *Didymosphenia geminata* in the continental US. *Frontiers in Ecology and Environment* 7:415-420. doi:10.1890/080054. \\\

LADRERA, R., GOMÀ, J. & PRAT, N. 2016. Regional distribution and temporal changes in density and biomass of *Didymosphenia geminata* in two Mediterranean river basins. *Aquatic Invasions*. 11(4): 355-367. DOI: <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2016.11.4.02>. \\\

LANG, I. & KACZMARSKA, I. 2011. A protocol for a single-cell PCR of diatoms from fixed samples: method validation using *Ditylum brightwellii* (T. West) Grunow. *Diatom Research* 26: 43-49. \\\

LARNED, S., ARSCOTT, D., BLAIR, N., JARVIE, B., JELLYMAN, D., LISTER, K., SCHALLENBERG, M., SUTHERLAND, S., VOPEL, K. & WILCOCK, B. 2007. Ecological studies of *Didymosphenia geminata* in New Zealand, 2006–2007. NIWA Client Report CHC2007-070; NIWA Project MAF07507: 120 pp. \\\

LARNED, S., BIGGS, B., BLAIR, N., BURNS, C., JARVIE, B., JELLYMAN, D., KILROY, C., LEATHWICK, J., LISTER, K., NAGELS, J., SCHALLENBERG, M., SUTHERLAND, S., SYKES, J., W., T., VOPEL, K. & WILCOCK, B. 2006. Ecology of *Didymosphenia geminata* in New Zealand—Habitat and ecosystem effects—Phase 2., National Institute of Water and Atmospheric Research. New Zealand. \\\

LARSON, A. M. 2007. Relationships between nuisance blooms of *Didymosphenia geminata* and measures of aquatic community composition in Rapid Creek, South Dakota. Water Resources Assistance Program, Division of Financial and Technical Assistance, South Dakota Department of Environment and Natural Resources: vii 28 pp. \\\

LARSON E. I. & TAYLOR, B. W. 2011. Nutrient limitation of the bloom-forming diatom, *Didymosphenia geminata*, in ten rocky mountain streams. NABS, Annual meeting Session. \\\

LEISHMAN, M. R. & THOMSON, V. P. 2005. Experimental evidence for the effects of ad-

ditional water, nutrients and physical disturbance on invasive plants in low fertility Hawkesbury Sandstone soils, Sydney, Australia. *Journal of Ecology* 93: 38–49. \\\

LI, Y., XIE, P., GONG, Z., SHI, Z. 2003. Cymbellaceae and Gomphonemataceae (Bacillariophyta) from the Hengduan Mountains region (southwestern China). *Nova Hedwigia* 76: 507–536. \\\

LI, Y., XIE, P., GONG, Z. & SHI, Z. 2004. A survey of the Gomphonemaceae and Cymbellaceae (Bacillariophyta) from the Jolmolungma Mountain (Everest) Region of China. *Journal of Freshwater Ecology* 19: 189–192.\\

LINDSTRØM, E. & SKULBERG, O. M. 2008. *Didymosphenia geminata* - a native diatom species of Norwegian rivers coexisting with the Atlantic salmon. In: *Proceedings of the 2007 International Workshop on Didymosphenia geminata* (Eds Bothwell ML, Spaulding SA), Fisheries and Oceans Canada, Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2795, Nanaimo, Canada.\\

LITCHMAN, E. 2010. Invisible invaders: non pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 13: 1560–1572. \\\

LORD, J. K., 1866. *The Naturalist in Vancouver Island and British Columbia*, Vols. I, 2. Richard Bentley, London: 733 pp.\\

MACGILLIVARY, M. L. & KACZMARSKA, I. 2012. Genetic differentiation within the *Paralia longispina* (Bacillariophyta) species complex. *Botany*. 90: 205–222. \\\

MANN, D. G. 1999. *Phycological Reviews* 18. The species concept in diatoms. *Phycology* 38: 437–495. \\\

MANN, D.G. & EVANS, K.M. 2007. Molecular genetics and the neglected art of diatomics. In *Unravelling the Algae – The Past, Present and Future of Algal Systematics*, 231–265. CRC Press, Boca Raton, Florida. \\\

MANRIQUE, J. M., CALVO, A. Y. & JONES, L. R. 2012. Phylogenetic analysis of *Ostreococcus virus* sequences from Patagonian Coast. *Virus Genes* 45(2):316–26. \\\

MANRIQUE, J. M. & JONES, L. R. 2014. Genetic data generated from virus–host complexes obtained by membrane co-immobilization are equivalent to data obtained from tangential filtrate virus concentrates and virus cultures. *Virus Genes* 48: 160–167. \\\

MANRIQUE, J. M. & JONES, L. R. 2017. Are ocean currents too slow to counteract SAR11 evolution? A next-generation sequencing, phylogeographic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107:324–337. \\\

MCNYSET, K. M. & JULIUS, M. L. 2006. Potential geographic distribution of *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt in North America based on ecological niche models. In Spaulding, S., R. Wiltshire & L. Elwell (conference organizers), *Current Knowledge of Hydrobiology* (2009) 630:1–37 33. *Didymosphenia geminata*: Developing a Research and Management Response. Federation of Fly Fishers and EPA Region 8, held in association with Western Divi-

sion American Fisheries Society Annual Meeting, May 15–16, 2006, Montana State University, Montana, USA: 29 pp, p. 18. \\\

MEDLIN, L. K. 2016 Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. *Phycologia* 2016, 55 (1): 79-103.

MEDLIN, L. K. & KACZMARSKA, I. 2004. Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia* 43: 245-270. \\\

MEDLIN, L. K., KOOISTRA, W. H. C. F., GERSONDE, R., SIMS, P. A. & WELLBROCK, U. 1997. Is the origin of the diatoms related to the end-Permian mass extinction? *Nova Hedwigia* 65:1-11. \\\

MEDLIN, L. K., WILLIAMS, D. M. & SIMS, P. A. 1993. The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *European Journal of Phycology* 28: 261-275. \\\

METZELTIN, D. & LANGE-BERTALOT, H. 1995. Kritische Wertung der Taxa in *Didymosphenia* (Bacillariophyceae). *Nova Hedwigia* 60: 381–405. \\\

METZELTIN, D. & LANGE-BERTALOT, H. 2014. The genus *Didymosphenia* M. Schmidt. A critical evaluation of established and description of 11 new taxa. *Iconographia Diatomologica* 25: 1-293. \\\

MIETTINEN, A., HAILA, H., HYVÄRINEN, H., RINNE, K. & ERONEN, M. 2005. Eemianv-crustal deformation in the eastern Baltic area in the light of the new sites at Peski, Russia and Põhja-Uhtju, Estonia. *Quaternary International* 130: 31-42. \\\

MILLER, S. A., DYKES, D. D. & POLESKY, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 3. \\\

MILLER, M. P., MCKNIGHT, D. M., CULLIS, J. D., GREENE, A., VIETTI, K., LIPTZIN, D. 2009. Factors controlling streambed coverage of *Didymosphenia geminata* in two regulated streams in the Colorado Front Range. *Hydrobiologia* 630(1): 207-218. \\\

MOFFAT, M. C. 1994. An ultrastructural study of *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae). *Transactions of the American Microscopical Society* 113: 59-71. \\\

MONTECINO, V., MOLINA, X., KUMAR, S., CASTILLO, M. L. C. & BUSTAMANTE, R. O. 2014. Niche dynamics and potential geographic distribution of *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt, an invasive freshwater diatom in Southern Chile. *Aquatic Invasions* 9: 507-519. \\\

MONTECINO, V., MOLINA, X., BOTHWELL, M., MUÑOZ, P., CARREVEDO, M. L., SALINAS, F., KUMAR, S., CASTILLO, M. L., BIZAMA, G., BUSTAMANTE, R. O. 2016. Spatio temporal population dynamics of the invasive diatom *Didymosphenia geminata* in central-southern Chilean rivers. *Science of the Total Environment*. 568: 1135-1145. \\\

MONTEIRO, L., BONNEMAISON, D., VEKRIS, A., PETRY, K.G., BONNET, J., VIRAL, R., CABRITA, J. & MÉGRAUD, F. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces:

- Helicobacter pylori model. Journal of Clinical Microbiology 35: 995–998. \\\
- MOON-VAN DER STAAY, S. Y., DE WACHTER, R. & VAULOT, D. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. Nature 409: 607–610. \\\
- MOREIRA-MUÑOZ, A. 1996. Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) y sus aplicaciones en la conservación de la diversidad biológica. Ambiente y Desarrollo 12: 80–86. \\\
- MORENO, P., MOLINARI, L., KURODA, J., DEMICHELI, M. & HUALDE, P. 2011. Primer reporte del alga invasora *Didymosphenia geminata* en el río Collón Cura, Provincia del Neuquén. \\\
- MROZIŃSKA, T., CZERWIK-MARCINKOWSKA, J. & GRADZISKI, M. 2006. A new species of *Didymosphenia* (Bacillariophyceae) from the Western Carpathian Mountains of Poland and Slovakia. Nova Hedwigia 83: 499–510. \\\
- NAKOV, T., SPAULDING, S. A. & THERIOT, E. C. 2008. A preliminary phylogeny of the Cymbelloid diatoms using molecular data with emphasis on the genera *Didymosphenia* M. Schmidt and Navicymbula Krammer. In: Phycological Society of America Annual Meeting, New Orleans. Phycological Society of America. \\\
- NAUMOSKI, A., MIRCEVA, G. & MITRESKI, K. 2011. Fuzzy models with GIS for water quality diatom-indicator classification, in: 2011 Eighth International Conference on Fuzzy Systems and Knowledge Discovery (FSKD). IEEE, pp. 829–833. doi:10.1109/FSKD.2011.6019732. \\\
- NYLANDER, J.A., 2004. MrAIC.pl, Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. \\\
- OTTO, S. & WHITLOCK, M. 1997. The probability of fixation in populations of changing size. Genetics 146: 723–733. \\\
- PANDEY, R. N., ADAMS, R. P. & FLOURNOY, L. E. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. Plant Molecular Biology Reporter 14: 17–22. \\\
- PATRICK, R. & REIMER, C. W. 1975. The diatoms of the United States, exclusive of Alaska and Hawaii, Vol. 2, pt. 1, Monograph No. 13. Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia, Philadelphia. \\\
- PITE, D. P., LANE, K. A., HERMANN, A. K., SPAULDING, S. A. & FINNEY, B. P. 2009. Historical abundance and morphology of *Didymosphenia* species in Naknek Lake, Alaska. Acta Botanica Croatica 68: 183–197. \\\
- POLYAKOVA, Y.I. & STEIN, R. 2004. Holocene paleoenvironmental implications of diatom and organic carbon records from the southeastern Kara Sea (Siberian Margin). Quaternary Research, 62, 256–266. \\\
- PONTIROLI, A., TRAVIS, E. R., SWEENEY, F. P., PORTER, D., GAZE, W. H., MASON, S., HIBBERD, V., HOLDEN, J., COURTENAY, O. & WELLINGTON, E. M. H. 2011. Pathogen quantitation in complex matrices: a multi-operator comparison of DNA extraction methods

with a novel assessment of PCR inhibition. PLoS One 6: e17916. \\\

POREBSKI, S., BAILEY, L. G. & BAUM, B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15: 8–15.\\

POTAPOVA, M. G. & CHARLES, D. F. 2002. Benthic diatoms in USA rivers: distributions along spatial and environmental gradients. Journal of Biogeography 29:167-187. \\\

PYŠEK, P., RICHARDSON, D. M., PERGL, J., JAROŠÍK, V., SIXTOVÁ, Z., WEBER, E. 2008. Geographical and taxonomic biases in invasion ecology. TREE 23:237-244. \\\

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>. \\\

RAMACHANDRA, T. V. & AHALYA, N. 2001. Monograph on Essentials in Limnology and GIS. Karnataka Environment Research Foundation, Bangalore. \\\

REID, B. L., HERNÁNDEZ, K. L., FRANGÓPULOS, M., BAUER, G., LORCA, M., KILROY, C. & SPAULDING, S. 2012. The invasion of the freshwater diatom *Didymosphenia geminata* in Patagonia: prospects, strategies, and implications for biosecurity of invasive microorganisms in continental waters. Conservation Letters 5: 432-440. \\\RICHARDSON, D. M. & PYŠEK, P. 2006. Plant invasions merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. Progress in Physical Geography 30, 409–431. \\\

RICHTEN, M. L. & BARBAR, P. H. 2005. A technique for the rapid extraction of microalgal DNA from single live and preserved cells. Molecular Ecology Notes 5:688-691. \\\

RIVERA, P. & GEBAUER, M. 1989. Chilean diatoms included in the Boyer's, Cleve & Moeller's, Schulze's and Smith's collections, deposited at the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Gayana Botánica 46: 89-116. \\\

RIVERA, P., BASUALTO, S. & CRUCES, F. 2013. Acerca de la diatomea *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: su morfología y distribución en Chile. Gayana Botánica 70: 154-158. \\\

RODRIGUEZ, S. M., GOLEMBA, M. D., CAMPOS, R. H., TRONO, K. & JONES, L. R. 2009. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel CLADES. Journal of General Virology 90:2788-2797. \\\

ROGERS, S. O. & BENDICH, A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology 5, 69–76. \\\

ROMAN, J. & DARLING, J. 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. TREE 22:454-464. \\\

ROUND, F. E., CRAWFORD, R. M. & MANN, D. G. 1990. The Diatoms – Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press, Cambridge, UK. \\\

RUTLEDGE, R.G. & STEWART, D. 2008. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 9: 96. \\\

SALA, O. E., CHAPIN, F. S., ARMESTO, J. J., BERLOW, E., BLOOMFIELD, J., DIRZO, R., HUBER-SANWALD, E., HUENNEKE, L. F., JACKSON, R. B., KINZIG, A., LEEMANS, R., LODGE, D. M., MOONEY, H. A., OESTERHELD, M., LEROY POFF, N., SYKES, M. T., WALKER, B. H., WALKER, M. & WALL, D. H. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770-1774. \\\

SALA, S., SPAULDING, S., FERRARIO, M., LAMARO, A., 2013. Presencia de *Didymosphenia geminata* en Tierra del Fuego, in: XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica. Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica. pp. 174–175. \\\

SALEM, B.B. 2003. Application of GIS to biodiversity monitoring. *Journal of Arid Environments* 54: 91-114. doi:10.1006/jare.2001.0887. \\\

SALGADO-SALAZARA, C., JONES, L. R., RESTREPO, A. & MCEWEN, J. G. 2010. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics* 26:613-624. \\\

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. \\\

SANMIGUEL, A., BLANCO, S., ÁLVAREZ BLANCO, I., CEJUDO FIGUEIRAS, C., ESCUDERO, A., PÉREZ, M.E., NOYÓN, G. & BÉCARES, E., 2016. Recovery of the algae and macroinvertebrate benthic community after *Didymosphenia geminata* mass growths in Spanish rivers. *Biological Invasions* 18:1467-1484. doi:10.1007/s10530-016-1095-4. \\\

SARMAJA-KORJONEN, K. & ALHONEN, P. 1999. Cladoceran and diatom evidence of lake-level fluctuations from a Finnish lake and the effect of aquatic moss layers on microfossil assemblages. *Journal of Paleolimnology*, 22, 277–290. \\\

SASTRE, V., BAUER, G. & AYESTARÁN, M. G. 2010a. Monitoreo de *Didymosphenia geminata*. Informe N° 5: Resultados Muestreo 31 de Agosto, 2 y 7 de Septiembre de 2010. Laboratorio de Hidrobiología, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew-Esquel. 22 pp. \\\

SASTRE, V., BAUER, G. & AYESTARÁN, M. G. 2010b. Monitoreo de *Didymosphenia geminata*. Informe N° 8: Resultados Muestreo 21 de Septiembre de 2010. Laboratorio de Hidrobiología, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew-Esquel. 12 pp. \\\

SASTRE, V., BAUER, G., AYESTARÁN, M. G. & SANTINELLI, N. 2011. Monitoreo de *Didymosphenia geminata*. Informe N° 29: Resultados Muestreo Agosto 2011. Laboratorio de Hidrobiología, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew-Esquel. 8 pp. \\\

SASTRE, V., BAUER, G., AYESTARÁN, M. G. & SANTINELLI, N. 2012a. Monitoreo de

— *Didymosphenia geminata*. Informe N° 48: Parque Nacional Los Alerce: Río Arrayanes, Frey, Carrileufu y Rivadavia. Muestreo Agosto 2012. Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew-Esquel. 7 pp. \\\

SASTRE, V., BAUER, G. & SANTINELLI, N. 2012b. Monitoreo de *Didymosphenia geminata*. Informe N° 52: Río Azul y Quemquemtrey (Cuenca del Río Puelo). Muestreo de Noviembre 2012. Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew-Esquel. 8 pp. \\\

SASTRE, A. V., SANTINELLI, N. H., BAUER, G. A., AYESTARÁN, M. G. & UYUA, N. M. 2013. First record of the invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt in a Patagonian Andean river of Argentina. *BioInvasions Records* 2: 11-17. \\\

SCHMIDT, A. 1899. Atlas der Diatomaceen-Kunde. Series V, Heft 54 – O.R. Reiland, Leipzig. \\\

SEASTEDT T. 2015. Biological control of invasive plant species: a reassessment for the Anthropocene. *New Phytologist* 205:490-502. \\\

SECRETARÍA DE DESARROLLO SUSTENTABLE Y AMBIENTE. DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS HIDRICOS. Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur República Argentina NOTA Nro.1077/ 14.USHUAIA. \\\

SEGURA, P. 2011. A slimy invader blooms in the rivers of Patagonia. *News of the week. Science* 331:18. \\\

SHARMA, S., SHARMA, K. K. & KUHAD, R. C. 2014. An efficient and economical method for extraction of DNA amenable to biotechnological manipulations, from diverse soils and sediments. *Journal of Applied Microbiology* 116, 923–933. \\\

SHERBOT, D. J. M. & BOTHWELL, M. L. 1993. *Didymosphenia geminata* (Gomphonemaceae). A review of the ecology of *D. geminata* and the physiochemical characteristics of endemic catchments on Vancouver Island. NHRI Contribution 93005. National Hydrology Research Institute, Environment Canada, Saskatoon. \\\

SHULTZ, L., 2000. Using geographical information systems in floristic studies. *Botanical Miscellany*. 73–81. \\\

SIMONELLI, P., TROEDSSON, C., NEJSTGAARD, J. C., ZECH, K. & LARSEN, J. B. 2009. Evaluation of DNA extraction and handling procedures for PCR-based copepod feeding studies. *Journal of Plankton Research* 31, 1465–1474. \\\

SIMS, P. A., MANN, D. G. & MEDLIN, L. K. 2006. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* 45, 361–402. \\\

SIVARAJAH, B., KUREK, J., RÜHLAND, K. M., SMOL, J. 2015. Effects of *Didymosphenia geminata* blooms on benthic diatom assemblages in the Restigouche River Watershed, eastern Canada. *Botany* 93(5):317-323. \\\

SMOL, J. P. & STOERMER, E. F. 2010. The Diatoms. Applications for the Environmental and Earth Sciences, second ed. Cambridge University Press, Cambridge. \\\

- SORHANNUS U. 2004. Diatom phylogenetics inferred based on direct optimization of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Cladistics*, 20, 487–497. \\\
- SPAULDING, S. & ELWELL, L. 2007. Increase in nuisance blooms and geographic expansion of the freshwater Diatom: *Didymosphenia geminata*. Recommendations for response. Open-file report 2007-1425. U.S. Geological Survey, Denver, Colorado. \\\
- STEIN, J. R. & BORDEN, C. A. 1979. Checklist of Freshwater Algae of British Columbia. Canadian Contribution to the UNESCO Program on Man and the Biosphere (MAB). *Syesis* 12: 3–39. \\\
- STOERMER, E. F., QI, Y. & LADEWSKI, T. B. 1986. A quantitative investigation of shape variation in *Didymosphenia* (Lyngbye) M. Schmidt (Bacillariophyta). *Phycologia* 25, 494–502. \\\
- STOERMER, E.F. 1993. Evaluating diatom succession: some peculiarities of the Great Lakes case. *Journal of Paleolimnology* 8, 71–83. \\\
- STOERMER, E. F. & JULIUS, M. L. 2003. Centric Diatoms. In: *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (Eds Wehr JD, Sheath RG), pp. 559–594. Academic Press, USA. \\\
- SUNDARESHWAR, P. V., UPADHAYAY, S., ABESSA, M., HONOMICHL, S., BERDANIER, B., SPAULDING, S. A., SANDVIK, C., TRENNPOHL, A., 2011. *Didymosphenia geminata*: algal blooms in oligotrophic streams and rivers. *Geophysical Research Letters* 38, 1–5. \\\
- TAUTZ, D. & RENZ M. 1983. An Optimized Freeze-Squeeze Method for the Recovery of DNA Fragments from Agarose Gels. *Analytical Biochemistry* 132: 14–19. \\\
- TAYLOR, B. W., & BOTHWELL, M. L. 2014. The Origin of Invasive Microorganisms Matters for Science, Policy, and Management: The Case of *Didymosphenia geminata*. *Bioscience* 64, 531–538. \\\
- THERIOT E. C., CANNONE J. J., GUTELL R. R. & ALVERSON A. J. 2009. The limits of nuclear-encoded SSU rDNA for resolving the diatom phylogeny. *European Journal of Phycology* 44: 277–290. \\\
- THERIOT, E. C., ASHWORTH, M., RUCK, E., NAKOV, T. & JANSEN, R. K. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution* 143: 278–296. \\\
- TOMÁS, P., OSCOZ, J., DURÁN, C., FERNÁNDEZ, D. & MARÍN, J.P. 2010. Distribution of the bloomforming diatom *Didymosphenia geminata* in the Ebro River basin (Northeast Spain) in the period 2006–2009. *Aquatic Invasions* 5, 285–289. \\\
- UYUA, N., LAMARO, A., SALA, S., PISONERO, J., SASTRE, V. & SANTINELLI, N. 2016a. Distribution of the invasive diatom *Didymosphenia geminata* in Andean-Patagonia Argentina. Conference: Marine and Freshwater Invasive Species: Ecology, Impact, and Management. Museo Argentina de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia. Buenos Aires, Argentina. 2 al 4 de Mayo de 2016. Página 78. \\\

BIOBLOGRAFÍA

- VOILLOUD, A. A. 2003. Catálogo de diatomeas continentales y marinas de Argentina. Asociación Argentina de Ficolología. 308p. \\\
- WATSON, S. B., WHITTON, B. A., HIGGINS, S. N., PAERL, H. W., BROOKS, B. W., WEHR, J. D., 2015. Harmful algal blooms. In Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, R.P. (eds) Freshwater Algae of North America: Classification and Ecology. 2nd edition. Academic Press. \\\
- WHITTON, B. A., ELLWOOD, N. T. W. & KAWECKA, B. 2009. Biology of the freshwater diatom *Didymosphenia*: a review. Hydrobiologia 630:1–37. \\\
- WILLIAMS, D. M. 2007. Diatom phylogeny: Fossils, molecules and the extinction of evidence. Comptes Rendus Palevol, 6, 505–514. \\\
- ZIMMERMANN, J., JAHN, R. & GEMENHOLZER, B. 2011. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. Organisms Diversity and Evolution.11:173-192. \\\

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

16S	Gen ribosomal 16S
18S	Gen ribosomal 18S
AC	Anhidrasa carbónica
AcNa	Acetato de Sodio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Enzima desoxirribonucleasa
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ANOVA	Análisis de la varianza en una vía
ARN	Ácido ribonucleico
C	Cloroformo
°C	Grados Celsius
CH	Cheles-100
CILi	Cloruro de Litio
CINa	Cloruro de Sodio
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de Carbono
COX-1	Gen de la subunidad 1 de la Citocromo oxidasa C
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CTABCH	Bromuro de cetiltrimetilamonio y Chelex-100
DE	Desvío estándar
dNTPs	Mezcla en partes iguales de los cuatro nucleótidos trifosfato (Adenina, Timina, Citocina y Guanina)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EO	Extracción orgánica
F	Fenol
FM	Floraciones masivas
GPS	Sistema de posición geográfica
HCl	Ácido clorhídrico

ABREVIATURAS	I	Alcohol isoamílico
—	Kb	Mil bases
	Kpb	Mil pares de bases
	L	Litro
	M	Molar
	m2	Metros cuadrados
	MEB	Microscopio electrónico de barrido
	µg	Microgramo/s
	mg	Miligramo/s
	µm	Microméetro/s
	mM	MiliMolar
	µL	Mililitro/s
	MO	Microscopio óptico
	MPI	Aislamiento mediante pipeteo con la boca
	Nm	Nanómetro
	OD	Oxígeno disuelto
	P	Fósforo
	Pb	Pares de base
	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	Pk	Proteinasa K
	ppb	Partes por billón
	PVP	Polivinilpirrolidona
	<i>rbcl</i>	Gen de la subunidad mayor de la ribulosa 1-5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
	SDS	Dodecilsulfato de sodio SIG = Sistema de Información Geográfica
	SO	Precipitación salina
	TE	Tris- ácido etilendiaminotetraacético

ANEXOS

I. Soluciones

II. Resultados adicionales

III. Sitios de muestreos

AI.1 Preparaciones de agentes orgánico

✓ Fenol: cloroformo: alcohol Isoamílico (25:24: 1)

Una mezcla que consiste de partes iguales de fenol equilibrado y cloroformo: alcohol isoamílico se utiliza con frecuencia para eliminar las proteínas a partir de preparaciones de ácidos nucleicos. El cloroformo desnaturaliza las proteínas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica, y el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción. El cloroformo y el alcohol isoamílico no requieren tratamiento antes de su uso. El fenol: cloroformo: alcohol isoamílico puede ser almacenado bajo 100 mM Tris-Cl (pH 8,0) en una botella hermética a 4 °C durante períodos de hasta 1 mes.

AI.2. Soluciones stock de químicos

✓ Acetato de Sodio (3 M, pH 5,2)

Disolver 408,3 g de acetato de sodio-3H₂O en 800 ml de H₂O. Ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial. Ajuste el volumen a 1 litro con H₂O. Distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave.

✓ Desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs)

Disolver cada dNTP en H₂O a una concentración aproximada de 100 mM.

Para reacciones en cadena de polimerasa (PCR), ajustar la solución dNTP a pH 8,0 con NaOH 2 N. Las soluciones comercialmente disponibles de dNTPs grado-PCR no requieren ajustes.

✓ EDTA (0,5 M, pH 8,0)

Añadir 186,1 g de EDTA disódico-2H₂O a 800 ml de H₂O. Agitar vigorosamente en un agitador magnético. Ajustar el pH a 8,0 con NaOH (~20 g de gránulos de NaOH). Distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave. La sal disódica de EDTA no entra en solución hasta que el pH de la solución se ajusta a ~8,0 por la adición de NaOH.

✓ Bromuro de etidio (10 mg / ml)

Añadir 1 g de bromuro de etidio a 100 ml de H₂O. Agitar en un agitador magnético du-

rante varias horas para asegurar que el tinte se haya disuelto. Envolver el recipiente con papel de aluminio o transferir la solución a un frasco oscuro y almacenar a temperatura ambiente.

✓ *Cloruro de litio (LiCl, 5 M)*

Disolver 21,2 g de LiCl en un volumen final de 90 ml de H₂O. Ajustar el volumen de la solución a 100 ml con H₂O. Esterilizar la solución pasándola a través de un filtro de 0,22 µm filtro, o por auto-clavando durante 15 minutos a 15 psi (1.05 kg / cm²) en ciclo líquido. Almacenar la solución a 4 °C.

✓ *NaOH (10 N)*

La preparación de NaOH 10 N implica una reacción muy exotérmica, lo que puede provocar la rotura de recipientes de vidrio. Preparar esta solución con extremo cuidado en vasos de plástico. Para 800 ml de H₂O, añadir lentamente 400 g de granulos de NaOH sin dejar de remover. Como precaución adicional, coloque el vaso de precipitados sobre hielo. Cuando los gránulos se han disuelto completamente, ajustar el volumen a 1 litro con H₂O. Guardar la solución en un recipiente de plástico a temperatura ambiente. La esterilización no es necesaria.

✓ *NaCl (cloruro de sodio, 5 M)*

Disolver 292 g de NaCl en 800 ml de H₂O. Ajustar el volumen a 1 litro con H₂O. Distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave. Almacenar la solución de NaCl a temperatura ambiente.

✓ *SDS (20% w / v)*

También se llama lauril sulfato de sodio. Disolver 200 g de SDS en 900 ml de H₂O. Se calienta a 68 °C y se agita con un agitador magnético para ayudar a la disolución. Si es necesario, ajustar el pH a 7,2 mediante la adición de unas pocas gotas de HCl concentrado. Ajuste el volumen a 1 litro con H₂O. Almacenar a temperatura ambiente. La esterilización no es necesaria. No esterilizar en autoclave.

AI.3 Buffers

✓ *10X Tris EDTA (TE)*

pH7.6

100 mM Tris-Cl (pH 7.6)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Esterilizar en autoclave las soluciones durante 20 minutos a 15 psi (1.05 kg/cm²) en ciclo líquido. Almacenar a temperatura ambiente.

√ *Tris-Cl (7 M)*

Disolver 847.7 gr de Tris-base en 800 ml de H₂O. Ajustar el pH al valor deseado adiriendo HCl concentrado (0,1 N).

Deje que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de hacer los ajustes finales al pH. Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con H₂O. Distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave. Si la solución 1M tiene un color amarillo, descartarla y obtener Tris de mejor calidad. El pH de las soluciones de Tris es dependiente de la temperatura y disminuye ~0.03 unidades de pH por cada 1 °C de aumento de temperatura. Por ejemplo, una solución 0,05 M tiene valores de pH de 9,5, 8,9, y 8,6 en 5 °C, 25 °C, y 37 °C, respectivamente.

AI.4 Stock y buffers de enzimas√ *RNasa pancreatica (1 mg/ml)*

Disolver 2 mg de RNasa I pancreatica cruda (Sigma o equivalente) en 2 ml de TE (pH 7.6).

√ *Proteinasa K (20 mg/ml)*

Disolver el polvo liofilizado a una concentración de 20 mg/ml en Tris 50 mM (pH 8,0) estéril, acetato de calcio 1,5 mM. Dividir la solución madre en pequeñas alícuotas y almacenar a -20 °C. Cada alícuota se puede descongelar y volver a congelar varias veces, pero luego debe ser desechada. A diferencia de las preparaciones mucho más crudas de la proteasa (por ejemplo, pronasa), la proteinasa K no tiene que ser auto-digerido antes de su uso.

√ *Buffer Proteinasa K*

	Solución stock	Concentración en reacción	Buffer	Temperatura
Proteinas K	20 mg/ml	1 mg/ml	0,01 M Tris-HCl (pH 7,8) 2 nM Na ₂ EDTA 1% SDS	37-56 °C

AI.5 Buffers de Electroforesis y Geles de siembra√ *Buffer de Electroforesis en gel*

Buffer	Solución de trabajo	Solución stock
TAE	1 X 40 mM Tris-acetato 1 mM EDTA	50X 242 g de Tris base 57.1 ml de ácido acético glacial 100 ml de 0.5 M EDTA (pH 8.0)

RESULTADOS ADICIONALES

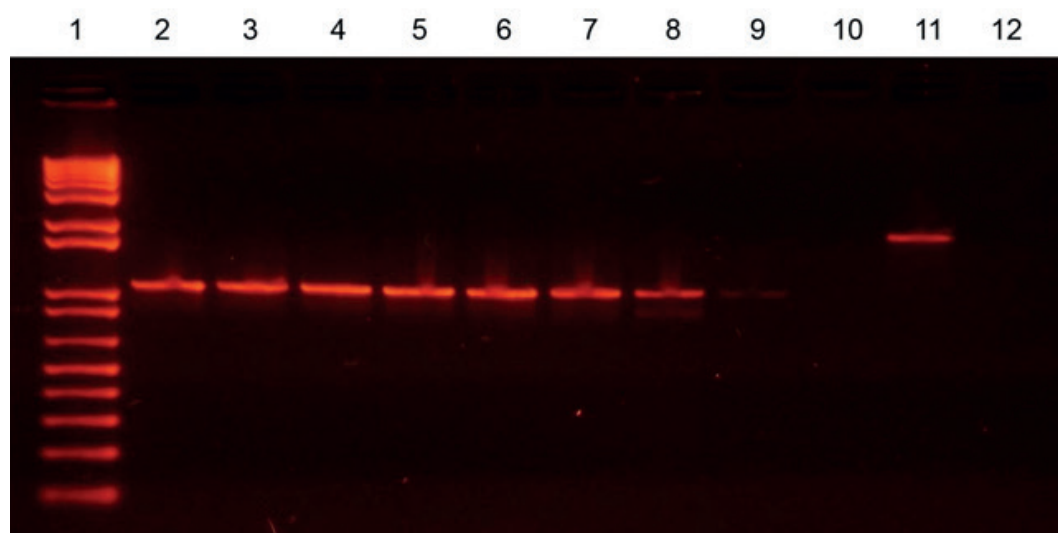
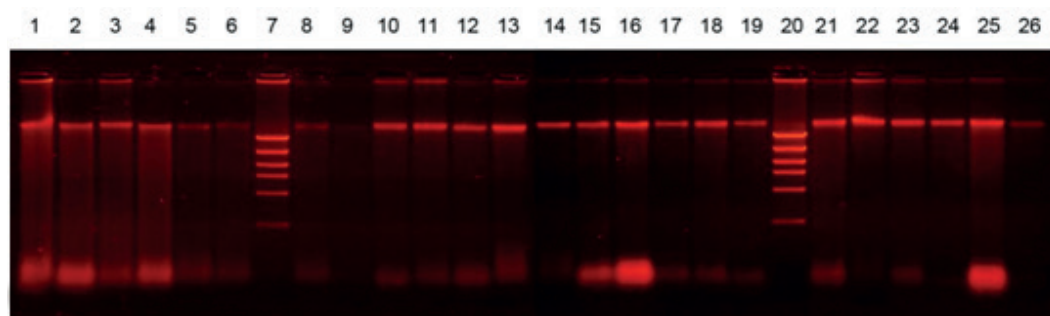


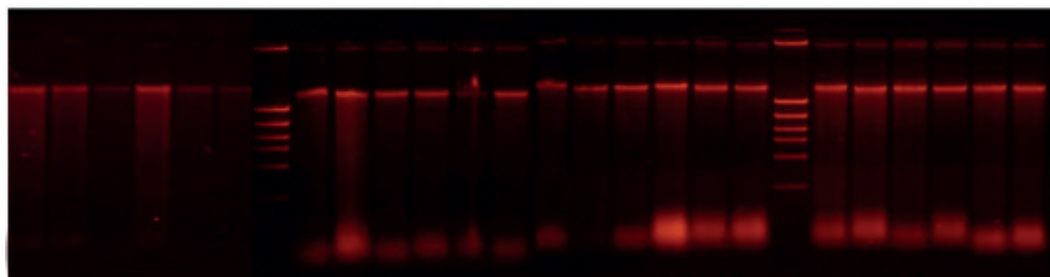
Fig. All.1. PCR en gradiente de temperaturas para la obtención de la temperatura óptima de *annealing* para el par de oligonucleótidos 602F y D1670R. **1:** marcador molecular (High Mass, invitrogen), **2 a 10:** temperaturas en °C: 49, 50.1, 52.1, 54.9, 58.7, 61.8, 63.8, 65. **11 y 12:** control (+) y control (-) respectivamente.

ANEXO II

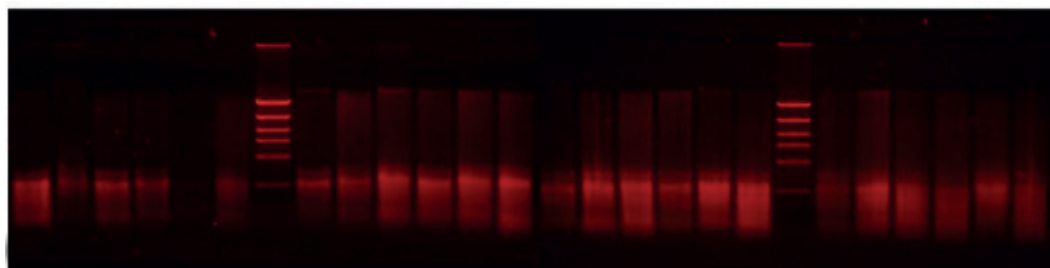
Resultados
adicionales



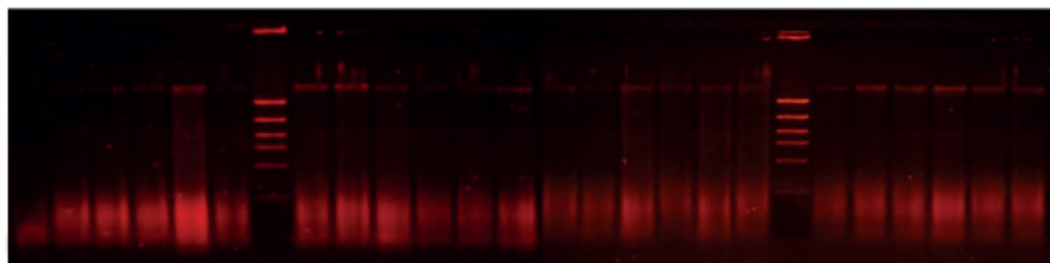
AII.2. A



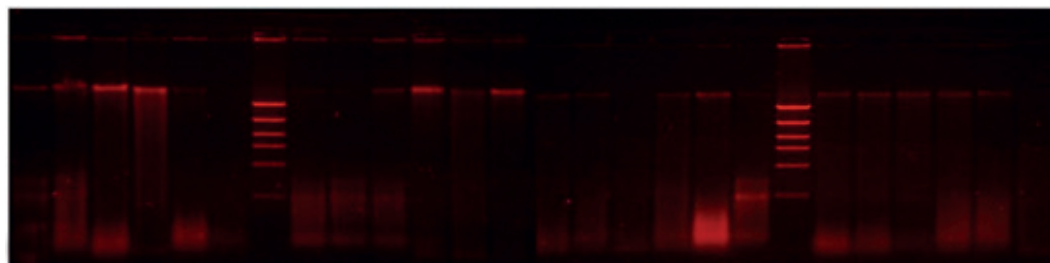
AII.2. B



AII.2. C



AII.2. D



AII.2. E

AII.2. Imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de las extracciones de ADN llevados a cabo con los distintos métodos testeados en este estudio. **A** CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio, **B** CTABCH: bromuro de cetiltrimetilamonio y Chelex-100, **C** EO: extracción orgánica, **D** LiCl: protocolo de cloruro de litio, y **E** SO: precipitación salina. No se muestra el gel de Chelex-10% ya que no hubo ADN detectable. **Calles 1-6, 8-19, 21-26:** Extractos de ADN; **Calles 7 y 20:** Marcador molecular High Mass (Invitrogen).

SITIOS DE MUESTREO

Tabla AIII.1. Sitios de muestreos del Plan de Monitoreo de *Didymosphenia geminata* en la Provincia del Chubut

N°	SITIO	COORDENADAS
	Cuenca del Río Puelo	
1	Río Azul	42° 05' 12.45" S - 71° 37' 10.41" O
2	Río Epuén	42° 08' 58.85" S - 71° 36' 02.44" O
3	Río Turbio	42° 13' 46.48" S - 71° 41' 03.17" O
4	Río Puelo	42° 06' 21.23" S - 71° 43' 33.90" O
5	Arroyo Pedregoso	42° 13' 41.87" S - 71° 40' 59.70" O
6	Arroyo Las Lágrimas	42° 05' 52.65" S - 71° 41' 05.11" O
7	Arroyo Melo	42° 06' 21.20" S - 71° 42' 18.12" O
8	Arroyo Agujas	42° 12' 41.79" S - 71° 41' 06.94" O
9	Lago Puelo Norte	42° 05' 52.11" S - 71° 36' 53.35" O
10	Lago Puelo Sur	42° 13' 40.30" S - 71° 39' 59.40" O
11	Arroyo Las Minas	
12	Arroyo Las Mercedes	
	Cuenca alta del Río Grande o Futaleufú	
13	Desembocadura del Río Tigre (Cholila)	42° 27' 25.6" S - 71° 44' 08.5" O
14	Embocadura del Río Carrileufu (Cholila)	42° 28' 02.6" S - 71° 36' 03.6" O
15	Embocadura del Río Mosquito (Cholila)	42° 30' 19.4" S - 71° 25' 18.7" O
	Cuenca media del Río Grande o Futaleufú (Parque Los Alerces)	
16	Río Carrileufu Desemb. en el Lago Rivadavia	43° 33' 38.7" S - 71° 37' 55.2" O
17	Costa del Lago Rivadavia	
18	Río Rivadavia confluencia con el río Colehuay	42° 40' 27.2" S - 71° 41' 56.7" O
19	Río Rivadavia (Canal de Doña Rosa)	42° 41' 27.3" S - 71° 42' 27.3" O
20	Río Rivadavia	42° 42' 33.9" S - 71° 43' 26.5" O
21	Río Rivadavia Desembocadura en el Lago Verde	42° 42' 37.3" S - 71° 43' 36.9" O
22	Costa del Lago Verde	
23	Río Arrayanes, Pasarela	42° 43' 34.2" S - 71° 44' 30.2" O
24	Arroyo El Francés	42° 47' 22.7" S - 71° 43' 39.7" O
25	Río Frey, Las Palanganas	42° 55' 43.0" S - 71° 42' 59.2" O
	Cuenca baja del Río Grande o Futaleufú: Principales tributarios	
26	Río Percy (Puente Viejo)	43° 04' 22.4" S - 71° 28' 16.4" O
27	Río Percy (Puente Nuevo)	43° 05' 21.5" S - 71° 28' 12.9" O
28	Cauce viejo Presa Futaleufú	43° 07' 41.6" S - 71° 37' 43.4" O
29	Río Corintos (Paso Ancho)	43° 09' 41.3" S - 71° 33' 10.0" O
30	Río Futaleufu Paraje Las Torres	43° 10' 44.7" S - 71° 39' 01.2" O
31	Arroyo Baggilt Desembocadura	43° 10' 07.7" S - 71° 34' 46.9" O
32	Arroyo Baggilt, Boca Toma	42° 12' 11.2" S - 71° 35' 09.3" O
33	Piscicultura Arroyo Baguilt Canal de salida	43° 11' 55.3" S - 71° 35' 11.0" O
34	Piscicultura Canal de ingreso	43° 11' 59.3" S - 71° 35' 09.5" O
35	Piscicultura Canal de desagüe piletas	43° 11' 56.4" S - 71° 35' 10.2" O

ANEXO III

Sitios de muestreo

Nº	SITIO	COORDENADAS
36	Isla frente al lodge Chaluquen	43° 10' 23.4" S - 71° 35' 41.1" O
37	Arroyo Blanco Desembocadura	43° 10' 26.6" S - 71° 36' 23.4" O
38	Recta de Toro	43° 10' 40.0" S - 71° 37' 48.1" O
39	Piedra del Ingles	43° 10' 44.9" S - 71° 39' 07.7" O
40	Isla Chica Burgos	43° 09' 53.8" S - 71° 43' 08.3" O
41	Río Futaleufú Puente Internacional	43° 10' 04.3" S - 71° 44' 15.6" O
42	Río Nant y Fall	43° 13' 23.0" S - 71° 25' 16.9" O
43	Arroyo El Blanco, Puente ruta prov. 258	43° 11' 46.9" S - 71° 36' 25.5" O
44	Río Huemul	43° 32' 13.2" S - 71° 28' 07.6" O
45	Arroyo Pedregoso	43° 37' 53.6" S - 71° 25' 29.0" O
	Cuenca del Río Carrenleufú o Corcovado	
46	Arroyo Guacho	43° 52' 21.6" S - 71° 25' 46.2" O
47	Río Carrenleufú o Corcovado (Pueblo)	43° 32' 35.9" S - 71° 29' 12.2" O
48	Río Carrenleufú o Corcovado (Lago Vinter)	43° 53' 53.4" S - 71° 25' 29.4" O
	Cuenca Río Pico	
49	Río Nilson	44° 16' 01.4" S - 71° 39' 01.1" O
50	Río Pico (Aldea Atilio Viglione)	44° 14' 29.7" S - 71° 42' 56.3" O
51	Río Pico desembocadura del Río Píldora	44° 14' 34.8" S - 71° 45' 03.3" O
52	Río Pico Puente camino al lago N° 1	42° 12' 20.2" S - 71° 25' 25.6" O
53	Río Pampa desemboque en el Río Pico	44° 14' 24.2" S - 71° 38' 55.9" O
54	Río Pampa	44° 11' 45.8" S - 71° 40' 03.6" O
55	Río Pampa (Aldea Atilio Viglione)	44° 11' 48.7" S - 71° 40' 03.8" O
	Cuenca del Río Chubut	
56	Río Tecka Pte Ruta N° 40	43° 27' 44.8" S - 70° 51' 21.3" O
57	Río Chubut (El Maiten)	
58	Río Chubut (Gualjaina)	

